

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 April 2001 (05.04.01)	
International application No. PCT/DE00/01863	Applicant's or agent's file reference DV-001 PCT
International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)
Applicant SCHATZ, Octavian	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
08 January 2001 (08.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

NT COOPERATION TREA.

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BOHMANN, Armin, K.
Bohmann & Loosen
Sonnenstr. 8
80331 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT	
International application No. PCT/DE00/01863	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address DIAVIR GMBH Steinbergstr. 30 D-85250 Altomünster Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality		
<input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address SLONING BIOTECHNOLOGY GMBH Steinbergstr. 30 D-85250 Altomünster Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Margret Fourné-Godbersen Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

NT COOPERATION TREA.

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BOHMANN, Armin, K.
Bohmann & Loosen
Sonnenstr. 8
80331 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT	
International application No. PCT/DE00/01863	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BETTENHAUSEN, Berthold
Müllerstrasse 1
D-80469 München
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

49(89) 2388 526

Facsimile No.

49(89) 2388 5270

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☒ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BOHMANN, Armin, K.
Bohmann & Loosen
Sonnenstr. 8
80331 München
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

49(89) 51 55 64 0

Facsimile No.

49(89) 51 55 64 13

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Please also note the new file reference as indicated above.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input checked="" type="checkbox"/> other: Bettenhausen, Berthold

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Margret Fourné-Godbersen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

BOHMANN & LOOSEN

To:

13. Juli 2001

Eing.

BOHMANN, Amin, K.

Bohmann & Loosen

Sonnenstr. 8

80331 München

ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

05 July 2001 (05.07.01)

Applicant's or agent's file reference

S 10002 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/DE00/01863

International filing date (day/month/year)

07 June 2000 (07.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

DIAVIR GMBH
Steinbergstr. 30
D-85250 Altomünster
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

SLONING BIOTECHNOLOGY GMBH
Steinbergstr. 30
D-85250 Altomünster
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the designated Offices concerned



the International Searching Authority



the elected Offices concerned



the International Preliminary Examining Authority



other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

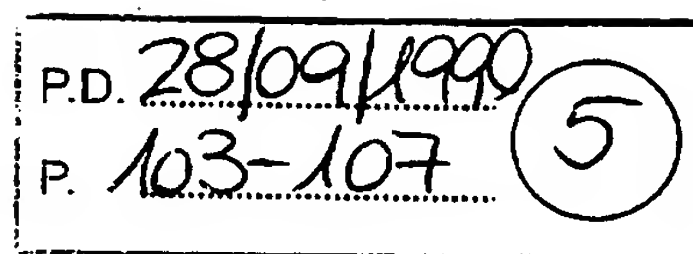
Authorized officer

Margret Fourné-Godbersen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

GENE 03699

Short Communications



A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in *Escherichia coli*

(Recombinant DNA; oligodeoxyribonucleotide; gene synthesis; β -lactamase; DNA replication; transcription terminator)

Wlodek Mandecki, Mark A. Hayden*, Mary Ann Shallcross and Elizabeth Stotland*

Corporate Molecular Biology, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064 (U.S.A.)

Received by F. Barany: 11 May 1989

Revised: 8 June 1990

Accepted: 11 June 1990

SUMMARY

A first totally synthetic *Escherichia coli* plasmid has been designed, constructed and shown to be a functional, stable, high-copy cloning vector. The *FokI* method of gene synthesis [Mandecki and Bolling, Gene 68 (1988) 101-107] was used to assemble the plasmid from 30 oligodeoxyribonucleotides. The plasmid contains synthetic modules for the β -lactamase-encoding gene (*bla*), replication origin, *lacZ* gene fragment and multicloning site. The plasmid is patterned after the pUC-type plasmids and has a copy number similar to that of pUC plasmids. The major changes introduced include the removal of nearly 50% of the restriction sites present in pUC plasmids, reduction of plasmid size to 2050 bp, and introduction of transcription terminators downstream from both the *bla* gene and *lacZ* fragment. The changes facilitate a number of techniques, such as cloning, mutagenesis, expression and restriction analysis.

INTRODUCTION

Two types of plasmids, pBR322 (Bolivar et al., 1977a) and pUC-type vectors (Vieira and Messing, 1982) and their derivatives, constitute a large fraction of vectors currently used for cloning. These vectors are spliced versions of plasmids that exist in nature. Therefore, their sequences have not been optimized (or optimized to a minimal degree) for features desirable in a recombinant DNA vector. Desirable characteristics, which might provide an added

convenience to DNA manipulations, include the smallest vector M_r possible, the absence/presence of certain type of restriction sites, the means to control the transcription processes, and others. Not every feature (e.g., single-strand *ori*) was incorporated as to keep a low M_r , but such module could easily be added to MCS.

Recent progress in molecular biology techniques enables construction of not only synthetic genes, but also of whole replicons. Synthetic plasmids or vectors can be custom-designed to suit the needs of a particular cloning or delivery method. This paper presents the construction of a family of totally synthetic plasmids, designed to aid general DNA cloning, mutagenesis and gene expression projects.

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Design of the plasmid

The overall design of the synthetic plasmid of *E. coli* was dictated by a set of desirable traits needed in a cloning/expression vector. One requirement was a low M_r of the

Correspondence to: Dr. W. Mandecki, Corporate Molecular Biology D93D, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064 (U.S.A.) Tel. (708)937-2236; Fax (708)688-6046.

* Present addresses: (M.A.H.) Department of Cellular and Molecular Biology, Northwestern University, Evanston, IL 60201 (U.S.A.) Tel. (708)491-2987; (E.S.) New Graduate College, Princeton University, Princeton, NJ 08544 (U.S.A.) Tel. (609)258-3000.

Abbreviations: aa, amino acid(s); Ap, ampicillin; bp, base pair(s); *bla*, gene encoding β -lactamase; MCS, multicloning site; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; *ori*, origin of DNA replication.

vector which would facilitate manipulations and purification of restriction fragments derived from it. Another favorable characteristic was the exclusion of as many restriction sites as possible, while introducing unique restriction sites at critical locations. Past experience has shown that subse-

quent subcloning of a DNA fragment entails a distinct disadvantage when cloning into a vector with many diverse restriction sites.

The synthetic plasmid was divided into three separate cassettes. First, the origin of replication from pUC9 (Vieira

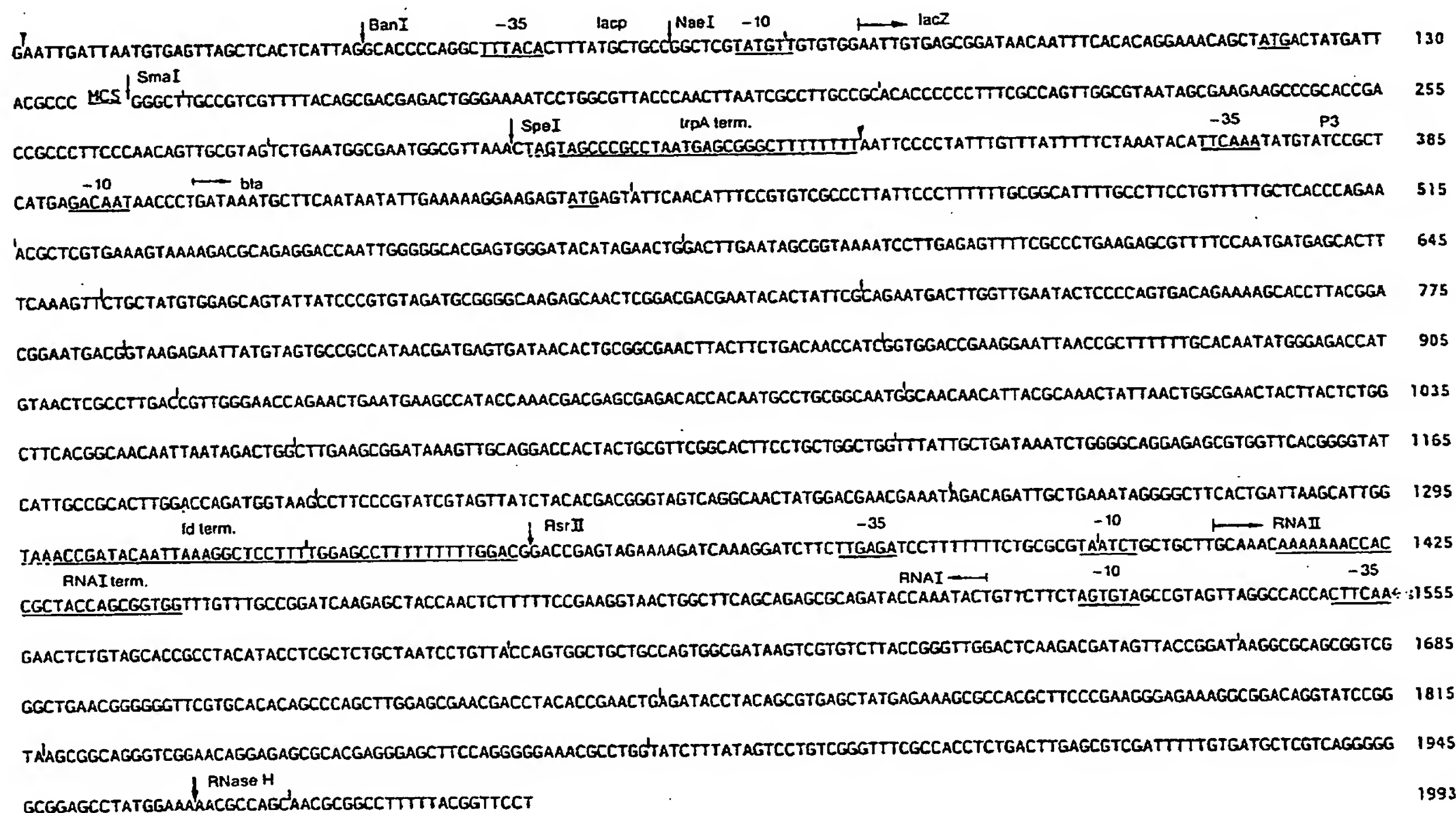


Fig. 1. Sequence of the synthetic plasmid. For pWM528 (which corresponds to pUC18), MCS = EcoRI SstI KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI HindIII GAATTTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT.

For pWM529 (which corresponds to pUC19), MCS = HindIII SphI PstI SalI XbaI BamHI SmaI KpnI SstI EcoRI AAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATGC;

pWM521 lacks the MCS. Transcription terminators (term.), -35 and -10 promoter regions, and fMet-encoding ATG triplets are underlined. Translational stop codons are underlined by dashes. Tails of horizontal arrows indicate *tsp*. A vertical heavy arrow indicates the RNaseH cleavage site (Bolivar et al., 1977b). Apostrophes indicate the division points and give the sequences of *FokI* fragments. The sequences of synthetic oligos were: arm 1 + sequence between division points + overlap of four 3' terminal residues + arm 2 (Mandecki and Bolling, 1988). The *FokI* fragments, and oligos, are numbered as indicated above the sequence. As shown, fragment 1 is composed of two discontinuous sequences. Arrowheads define the *lacZ* cassette. All oligos were synthesized on an Applied Biosystems 380A synthesizer using 5'-dimethoxytrityl nucleoside β -cyanoethyl phosphoramidites. Syntheses were carried out on a 0.2 μ M scale controlled pore-glass solid support with an average pore size of 1000 Å. Oligos were purified by gel electrophoresis. Cloning of the synthetic oligos was accomplished by the bridge mutagenesis protocol (Mandecki, 1986). All four cloning vectors (pWM500, pWM501, pWM502, pWM507) used for the *FokI* method of gene synthesis were cut with *SmaI*. Approximately 50 ng linearized vector was mixed with 20 pmol of oligo in 30 μ l of denaturation buffer (10 mM KCl/5 mM Tris · HCl pH 8.0/5 mM Mg SO₄/0.5 mM dithiothreitol) and heated at 100°C for 3 min in a boiling water bath. The samples were cooled to room temperature for 5 min and transferred to 200 μ l chilled competent JM83 cells (*ara*, Δ (*lac-proAB*), *strA*, *thi* (ϕ 80/*lacZ* Δ M15)). Competent cells were prepared by the CaCl₂ procedure. The DNA/cell mixture was chilled on ice for 5 min followed by a 3-min heat shock at 37°C. Approximately 2 ml of Luria-Bertani medium was added to the transformation mix, cells were incubated at 37°C for 1 h, and then plated. The types of cloning vectors used were as follows: pWM500 for fragments 2-14 and 26-29; pWM501-1 for 15-18, 24 and 25; pWM502 for 19-23, and pWM507 for fragment 30. Plasmid constructs containing the *FokI* fragments for the synthetic plasmid were digested as follows. Approximately 200 ng of each plasmid was cut with 90 units *FokI* (New England BioLabs). Reactions were carried out in 500 μ l volumes containing 1 \times *FokI* buffer (20 mM KCl/10 mM Tris · HCl pH 7.5/10 mM MgCl₂/10 mM 2-mercaptoethanol) at 37°C for 2.5 h. The insert-containing *FokI* fragments were then purified by 8% polyacrylamide gel electrophoresis. All 25 *FokI* fragments (100 ng each) were joined together in a single ligation reaction according to a standard protocol (Mandecki and Bolling, 1988). DNA sequencing revealed an inadvertent sequence change in the *ori* region of the final constructs compared to the pUC sequence, namely AT (in pUC) \rightarrow TA (in pWM521) at nt 1765 and 1766 of pWM521.

and Messing, 1982; and a correction from Minton et al., 1988) was chosen. The sequence contains both the RNA I and RNA II replication primer regions along with their respective promoters (Polisky, 1986; Muesing et al., 1981; Cesareni, 1982).

Second, the *bla* gene of the pUC plasmids was chosen as a selection marker. The gene included the natural *P3* promoter (Brosius et al., 1982) found in pUC9 and the strong phage fd gene *VIII* transcription terminator (Beck et al., 1978). In contrast to the *ori* region, the nt sequence for *bla* was changed to remove several restriction sites. In most cases (except Ile⁸² → Val, and Val¹⁸² → Ala) the aa sequence was maintained. Approximately 60% of the naturally occurring restriction sites were removed. Preferred *E. coli* codons were used (Guoy and Gauthier, 1982).

In addition to having an *ori* region and *bla* gene, the α -complementing *lacZ* gene fragment of pUC was also desirable because of its usefulness as a cloning marker. The *lacZ* nt sequence (but not the aa sequence) from pUC9 was changed to reduce the number of restriction sites in an analogous way to the *bla* gene. The *Sma*I site was maintained as a unique restriction site for the insertion of any other desired site(s).

(b) Genetic constructions

A total of 25 oligos were synthesized in the first stage of plasmid engineering. The constructions employed the *Fok*I method of gene synthesis (Mandecki and Bolling, 1988). The oligos were cloned into the pWM500 series of plasmids, purified and sequence verified prior to excision of the individual fragments by cutting with *Fok*I. All 25 fragments (ranging in size from 40–82 bp) contained unique complementary 4-bp overhangs which, when annealed and ligated, formed a complete closed circular vector. The fragments were ligated together and transformed into SCS-1-competent cells [F⁻, *recA* 1, *endA* 1, *gyrA* 96, *thi*, *hsdR* 17, (r_K^- , m_K^+), *supE* 44, *relA* 1, λ^-]. Transformed cells were plated on LB plates containing Ap (100 μ g/ml). Successfully transformed cells could only survive and form colonies if they carried the intact plasmid containing a functional origin of replication and *bla* gene.

In the second stage of plasmid constructions, the synthetic *lacZ* cassette (Yanisch-Perron et al., 1985) was cloned into the *Eco*RI site of the newly constructed plasmid using *Fok*I fragments indicated in Fig. 1. The cassette comprised the *lac* promoter, the *lacZ* gene fragment encoding 60 N-terminal aa of β -galactosidase, the *trpA* transcription terminator (Christie et al., 1981), and *Sma*I site for the introduction of an MCS site by bridge mutagenesis (Mandecki, 1986). The unique *Fok*I site located in the *bla* gene was then removed by bridge mutagenesis to allow the use of the synthetic plasmid as a cloning vector for the *Fok*I method of gene synthesis. The mutation caused no ob-

servable change in Ap resistance (data not shown).

Furthermore, a unique *Nae*I site was introduced into the spacer region of the *lacZp* promoter to enable to alter its length, and thereby regulate promoter strength using bridge mutagenesis (Mandecki and Reznikoff, 1982; Stefano and Gralla, 1982; Mandecki et al., 1985; Auble and deHaseth, 1988). This new synthetic plasmid construct was designated pWM521. Bridge mutagenesis was then used to clone the MCS from M13mp18 and M13mp19 (Yanisch-Perron et al., 1985) into the *Sma*I site within the *lacZ* gene. This was done to accommodate standard cloning protocols established for pUC18 and pUC19. The constructs containing the M13mp18 and M13mp19 MCS were named pWM528 and pWM529, respectively. The nt sequence of plasmid pWM521 is given in Fig. 1, and the list of restriction sites is presented in Table I.

(c) Characterization of the plasmid

Characterization of the synthetic plasmid was of interest since the plasmid constitutes the first totally synthetic replicon. It is significantly different from its prototype, the pUC-type plasmid. The synthetic plasmid, when compared to pUC-type plasmids, contains three deletions, the total length of which is 636 bp, as well as 70 point mutations. Nearly 50% of the restriction sites present in the pUC plasmids were removed. In particular, the pWM528 plasmid contains only seven sites (including three sites incorporated by design to facilitate manipulations) for restriction enzymes recognizing 6-bp nondegenerate sequences, while there are 24 such sites in the pUC plasmid, not including the MCS. The low number of such sites allows for the use of virtually any six-cutter for cloning, or mutagenesis of cloned genes by restriction fragment replacement with synthetic DNA or bridge mutagenesis. Plasmid pWM521 does not have cleavage sites for 75 restriction enzymes (Table I). The synthetic plasmid is missing the *P1* promoter for the *bla* gene (Brosius et al., 1982). It contains the minimum-length *ori*, two newly introduced transcription terminators and the minimum-length engineered *lacZp* promoter.

It was shown that the plasmid can be stably propagated for at least 120 generations (four passages on plates supplemented with 100 μ g Ap/ml). Thus the constructed fragment containing the *ori* region (nt 1349–1993 in Fig. 1) is fully capable of sustaining stable replication. The plasmid copy number was evaluated by scanning the density of plasmid DNA bands on a 1% agarose gel, measuring the yield of DNA from large DNA preparations and by assaying levels of β -lactamase (Jones et al., 1982). The copy number was found to be equivalent to that of pUC9, i.e., 500–700 copies per host (Minton et al., 1988). The plasmids express the *lacZ* gene fragment, resulting (in a proper host strain) in blue colonies on solid medium supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside. The plasmids

TABLE I

Restriction sites in plasmid pWM521

Enzyme ^a	Cut site					
<i>AluI</i>	22	117	1461	1718	1764	1854
<i>AluNI</i>	1609					
<i>ApaLI</i>	1704					
<i>AsuI</i>	543	862	1084	1180	1344	
<i>AvaI</i>	135					
<i>AvaII</i>	543	862	1084	1180	1344	
<i>BbvI</i>	45	1390	1596	1599	1689	
<i>BceII</i>	130	1057	1519			
<i>BinI</i>	1372	1374	1460			
<i>BsmAI</i>	162	389	898	964		
<i>BspHI</i>	386					
<i>BsrI</i>	171	223	581	751	1020	1063
	1491	1603	1616			
<i>CauII</i>	136	137	1641			
<i>Cfr10I</i>	61					
<i>CviJI</i>	22	44	65	117	140	246
	310	327	946	1036	1062	1115
	1194	1276	1316	1328	1461	1490
	1533	1544	1609	1688	1713	1718
	1764	1854	1952	1978		
<i>DdeI</i>	1744					
<i>DpnI</i>	1360	1368	1379	1454		
<i>Eco3II</i>	893					
<i>Eco57I</i>	638	1476				
<i>EcoRII</i>	39	176	1857	1870		
<i>FinI</i>	1791					
<i>Fnu4HI</i>	59	205	482	806	833	983
	1172	1404	1610	1613	1678	1821
	1976					
<i>FnuDII</i>	1394	1975				
<i>HaeI</i>	1544					
<i>HaeII</i>	1778					
<i>HaeIII</i>	1544	1978				
<i>HgaI</i>	544	1906				
<i>HgiAI</i>	643	1708				
<i>HgiCI</i>	34					
<i>HgiEII</i>	1430					
<i>HhaI</i>	1394	1503	1677	1777	1844	
<i>HinfI</i>	1648					
<i>HpaII</i>	62	136	1450	1640	1666	1813
<i>HphI</i>	499					
<i>Ksp632I</i>	427	614				
<i>MaeI</i>	304	1525				
<i>MaeIII</i>	182	753	906	1482	1598	1661
<i>MboI</i>	1358	1366	1377	1452		
<i>MboII</i>	252	444	631	1361		
<i>MfeI</i>	546					
<i>MmeI</i>	1625	1809				
<i>MnlII</i>	533	1591	1840	1915		
<i>MseI</i>	9	193	299	335	874	1012
	1051	1286	1310			
<i>NaeI</i>	63					
<i>NlaIII</i>	390	907				
<i>NlaIV</i>	36	929	1317	1327	1951	1990
<i>NspBII</i>	1435	1680				
<i>PleI</i>	1642					
<i>RsrII</i>	1344					
<i>ScrFI</i>	41	136	137	178	1641	1859
	1872					

TABLE I (continued)

Restriction sites in plasmid pWM521

Enzyme ^a	Cut site					
<i>SduI</i>	558	643	1708			
<i>SecI</i>	39	135	1858			
<i>SfaNI</i>	675	1921				
<i>SmaI</i>	137					
<i>SpeI</i>	303					
<i>SspI</i>	421					
<i>TaqI</i>	1920					
<i>TaqIIA</i>	524	879	1361			
<i>Tsp45I</i>	753					
<i>TspEI</i>	2	81	98	336	547	793
	871	1048	1307			
<i>Tth111II</i>	1395	1427	1434			
<i>VspI</i>	9	1051				
<i>XhoII</i>	1366	1377				

^a Restriction enzymes used for analysis are as compiled in the Intelligenetics Sequence Analysis System, Version 5.3, January 1989. The Prototypes subset, which does not contain isoschizomers, was used. No restriction sites are present in pWM521 for the following enzymes:

<i>AatII</i>	<i>AccI</i>	<i>AcyI</i>
<i>AflIII</i>	<i>AflIII</i>	<i>AhaIII</i>
<i>ApaI</i>	<i>AsuII</i>	<i>AvaIII</i>
<i>AvrII</i>	<i>BalI</i>	<i>BamHI</i>
<i>BbvII</i>	<i>BclI</i>	<i>BglII</i>
<i>BglII</i>	<i>BsePI</i>	<i>BsmI</i>
<i>BspMI</i>	<i>BspMII</i>	<i>BstEII</i>
<i>BstXI</i>	<i>CfrI</i>	<i>ClaI</i>
<i>DraII</i>	<i>DraIII</i>	<i>DsaI</i>
<i>Eco47III</i>	<i>EcoNI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>EcoRV</i>	<i>EspI</i>	<i>FokI</i>
<i>GdiII</i>	<i>GsuI</i>	<i>HgiIII</i>
<i>HindII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HpaI</i>
<i>KpnI</i>	<i>MaeII</i>	<i>MluI</i>
<i>MstI</i>	<i>NarI</i>	<i>NcoI</i>
<i>NdeI</i>	<i>NheI</i>	<i>NotI</i>
<i>NruI</i>	<i>NspI</i>	<i>PfIMI</i>
<i>PmaCI</i>	<i>PpuMI</i>	<i>PstI</i>
<i>PvuI</i>	<i>PvuII</i>	<i>RsaI</i>
<i>SacI</i>	<i>SacII</i>	<i>Sall</i>
<i>SauI</i>	<i>ScaI</i>	<i>SfiI</i>
<i>SnaBI</i>	<i>SnaI</i>	<i>SphI</i>
<i>SpII</i>	<i>StuI</i>	<i>StyI</i>
<i>TaqIIB</i>	<i>Tth111I</i>	<i>XbaI</i>
<i>XhoI</i>	<i>XmaIII</i>	<i>XmnI</i>

have been used for cloning of a variety of genes (data not shown). Lower-copy-number plasmids (150 copies per host) are also available.

(d) Conclusions

While maintaining the desirable features of the pUC plasmids, the pWM series of synthetic plasmids provide replicons of smaller size, fewer restriction sites and cassette-type organization. Thus, the synthetic plasmid is a very

flexible and efficient vector for general cloning purposes, mutagenesis and expression.

Rapid accumulation of DNA sequencing data together with an improvement in understanding the structure and function of biomolecules and the development of methods for designing novel biomolecules create a need for the synthesis/assembly of increasingly longer DNA molecules. This study has demonstrated that the *FokI* method, which provides for the accurate construction of large DNA fragments in one ligation, is very well suited for that purpose.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Michael Dabrowski for technical assistance, Tom Kavanaugh for oligo synthesis, Dave Backer for DNA sequencing, Tim Bolling, Michael Klass and Owen McCall for reading the manuscript, and Sue Hopkins for editing.

The plasmid vectors described in this paper are available upon request from the authors.

REFERENCES

- Auble, D.T. and deHaseth, P.L.: Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Influence of DNA structure in the spacer separating the -10 and -35 regions. *J. Mol. Biol.* 202 (1988) 471-482.
- Beck, E., Sommer, R., Auerswald, E.A., Kurz, Ch., Osteburg, G., Schaller, H., Sugimoto, K., Sugisaki, H., Okamoto, T. and Takanami, M.: Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA. *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 4494-4510.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977a) 95-113.
- Bolivar, F., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Shine, J., Rodriguez, R.L. and Boyer, H.W.: Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977b) 5265-5369.
- Brosius, J., Cate, R.L. and Perlmutter, A.P.: Precise location of two promoters for the β -lactamase gene of pBR322. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 9205-9210.
- Cesareni, G.: The RNA primer promoter, as defined in vitro, is essential for pMB1 plasmid replication in vivo. *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 123-126.
- Christie, G.C., Farnham, P.J. and Platt, T.: Synthetic sites for transcription termination and a functional comparison with tryptophan operon termination sites in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4180-4184.
- Guoy, M. and Gautier, C.: Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 7055-7074.
- Jones, R.N., Wilson, H.W. and Novick, W.J.: In vitro evaluation of pyridine-2-azo-*p*-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other betalactam compounds. *J. Clin. Microbiol.* 15 (1982) 677-683.
- Mandecki, W.: Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7177-7181.
- Mandecki, W. and Bolling, T.J.: *FokI* method of gene synthesis. *Gene* 68 (1988) 101-107.
- Mandecki, W. and Reznikoff, W.S.: A *lac* promoter with a changed distance between -10 and -35 region. *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 903-912.
- Mandecki, W., Goldman, R.A., Powell, B.S. and Caruthers, M.H.: *lac* up-promoter mutants with increased homology to the consensus promoter sequence. *J. Bacteriol.* 164 (1985) 1353-1355.
- Minton, N.P., Chambers, S.P., Prior, S.E., Cole, S.T. and Garnier, T.: Copy number and mobilization properties of pUC plasmid. *Focus* 10 (1988) 56.
- Muesing, M., Tamm, J., Shepard, H.M. and Polisky, B.: Single base-pair alteration is responsible for the DNA overproduction phenotype of a plasmid copy-number mutant. *Cell* 24 (1981) 235-242.
- Polisky, B.: Replication control of the ColE1-type plasmids. In: Reznikoff, W.S. (Ed.), *Maximizing Gene Expression*, Butterworth, Boston, 1986, pp. 143-170.
- Stefano, J.E. and Gralla, J.D.: Spacer mutations in the *lacP_o* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1069-1072.
- Vieira, J. and Messing, J.: The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19 (1982) 259-268.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1985) 103-119.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts DV-001 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 01863	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/1999
Anmelder DIAVIR GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75368 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, (74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Müller-
C12N 15/10, A61K 48/00 strasse 1, D-80469 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01863 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): DE, JP, US.

(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juni 2000 (07.06.2000) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(30) Angaben zur Priorität:
199 25 862.7 7. Juni 1999 (07.06.1999) DE

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DIAVIR GMBH [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHATZ, Octavian [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).

(54) Title: METHOD FOR THE SYNTHESIS OF DNA FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON DNA-FRAGMENTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method that can be carried out in parallel and automated for the production of any nucleic acid, comprising the following steps: a) coupling an oligonucleotide to a solid matrix; b) adding an additional oligonucleotide; c) performing ligation of the oligonucleotide from steps a) and b) in an orientation; d) removing excess reactants and enzymes from the reaction preparation; e) effecting cleavage of the ligation product from step c) with a restriction system that cleaves outside the recognition sequence, whereby cleavage is effected in the shortened or lengthened oligonucleotide from step a) or in the oligonucleotide from step b); f) separating the reaction mixture from the lengthened or shortened oligonucleotide from step a); g) repeating at least one steps b) to f); h) performing successive sequence-independent linkage of the fragments obtained after executing steps a) to g) until the desired product is obtained.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein parallel ausführbares und automatisierbares Verfahren zur Herstellung einer beliebigen Nukleinsäure, umfassend die Schritte: a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix; b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids; c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in einer Orientierung; d) Entfernung überschüssiger Reaktanden und Enzyme aus dem Reaktionsansatz; e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem ausserhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung entweder im Oligonukleotid aus Schritt a) oder im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet; f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten oder verkürzten Oligonukleotid aus Schritt a); g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f); h) sukzessive sequenzunabhängige Verknüpfung der nach Durchführung der Schritte a) bis g) erhaltenen Fragmente bis zum Erhalt des gewünschten Produkts.

WO 00/75368 A2

,

,

,

,

5

Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten

Nach dem derzeitigen Stand der Technik müssen für eine Synthese einer etwa 2,5 kb großen
10 Nukleinsäuresequenz zunächst etwa 50 verschiedene, teilweise überlappende ca. 80mer Oligo-
nukleotide synthetisiert und aufgereinigt werden. Diese werden dann paarweise oder in Subsets
hybridisiert und mittels einer Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt oder mit den außen
liegenden Oligonukleotiden als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt und
(meist über einzubauende Restriktionsstellen) unidirektional miteinander verknüpft. Dieses
15 Verfahren ist als "Gap filling" Methode bekannt. Alternativ lassen sich Genfragmente durch
enzymatische oder chemische Ligation synthetisieren; diese Fragmente können dann nach
Aufreinigung und/oder Klonierung zu größeren Genabschnitten zusammengesetzt werden (sog.
Cassettenmethode). Beide Prozeduren erfordern im Idealfall mindestens eine Woche, im Regel-
fall jedoch eher 6-12 Wochen, mitunter sogar 6 Monate. Sequenzielle, an Festphasen gebundene
20 Verfahren haben wegen der Vielzahl der notwendigen Reaktionsschritte nur geringe Ausbeuten
und sind daher auch sehr fehleranfällig.

Eines der Hauptprobleme besteht darin, daß längere Oligonukleotide aus Gründen der
Kopplungseffizienz, die selbst bei gut verlaufenden Synthesen nur 99% pro Schritt erreicht,
25 immer einen unvermeidbaren Anteil an Abbruchprodukten aufweisen. Darüber hinaus kommt es
auch zu Deletionen, die aus nicht 100%igem Capping resultieren. Selbst bei sehr guten
Synthesen liegt dieser Anteil bei ca. 0,25% pro Kopplungsschritt. Auch die Abtrennung der
Tritylschutzgruppen nach Beendigung der Synthese verläuft nicht vollständig. Die so
entstandenen unvollständigen Oligonukleotidprodukte können selbst mit großem Aufwand von
30 längeren Oligonukleotiden nicht vollständig abgetrennt werden.

Bei einer durchschnittlichen Kopplungseffizienz von 98% erhält man beispielsweise bei einem
80mer eine Ausbeute des gewünschten Produkts mit voller Länge von lediglich 19.86%. Mit den
heutzutage verfügbaren Aufreinigungsverfahren kann das gewünschte Endprodukt in einer

Reinheit von bestenfalls 95% dargestellt werden. Auch wenn dann nur noch ein kleiner Teil der endgereinigten Oligonukleotide fehlerhaft ist, steigt dennoch die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Endsequenz mit der Zahl der eingesetzten Oligonukleotide dramatisch an. Eine Sequenz, die sich aus 50 der beschriebenen Oligonukleotide zusammensetzt, ist demnach nur in 7,7% aller Fälle korrekt und muss deshalb in aller Regel nachgearbeitet werden. Ein relativ seltener Einbau falscher Basen aufgrund von Fehlkopplungen während der Synthese ist dabei nicht berücksichtigt.

Auf Grund der Vielfalt möglicher Sequenzen selbst relativ kurzer Oligonukleotide (bereits von einem 30mer existieren über 10^{18} mögliche Sequenzvarianten) ist es zudem praktisch unmöglich, Oligonukleotide für verschiedene Genkonstrukte wieder zu verwenden. Daher ist es technisch nicht machbar, sämtliche zur Generierung beliebiger Sequenzen benötigte Oligonukleotide vorzuhalten. Für jedes neue Genkonstrukt müssen jeweils neue Oligonukleotide synthetisiert und aufgereinigt werden. Nur ein Bruchteil des synthetisierten Materials wird jedoch tatsächlich für die Gensynthese eingesetzt, der Rest kann aus oben beschriebenen Gründen nicht verwertet werden. Die nicht gelöste Einbindung der Oligonukleotidsynthese und deren Aufreinigung in den Gensyntheseprozess ist eines der Haupthindernisse, weswegen eine vollständige Automatisierung dieses Prozesses derzeit technisch nur äußerst schwierig und praktisch wahrscheinlich überhaupt nicht zu realisieren.

20

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung eines Verfahrens zur effizienten Synthese doppelsträngiger DNA-Fragmente beliebiger Sequenz und Länge. Eine weitere Aufgabe besteht darin, eine Methode bereit zu stellen, welche es erlaubt, beliebige DNA-Moleküle aus einer begrenzten Bibliothek von Grundbausteinen zusammen zu setzen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, ein Verfahren aufzuzeigen, welches die **parallele** Synthese und die **sequenzunabhängige** Verknüpfung beliebiger Genfragmente gestattet. Die Erfüllung dieser beiden Voraussetzungen ist notwendig für die Realisierung einer kompletten Automatisierung des Gensyntheseverfahrens. Eine weitere Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Kits zur automatisierten Herstellung doppelsträngiger DNA-Fragmente.

30

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypII Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- 5 b) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt a), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
- c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der
10 nicht zu ligierenden Enden vorgegebenen Orientierung,
- d) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet,
- 15 f) Abtrennen des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) bis d) wie oben,
- 20 e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
- f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
- 25 g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f).

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) bis g) wie oben,
- 30 h) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet, und gegebenenfalls

- i) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet.
- 5 Bevorzugt ist ein Verfahren, wobei nach Schritt c) als Schritt c)' eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes c)' nach der Reaktion entfernt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei in der letzten Wiederholung der Schritte b) bis f) der Schritt e) nicht durchgeführt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die erhaltene Nukleinsäure durch
- 10 Restriktionsspaltung vom Oligonukleotid aus Schritt a) abgetrennt wird. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Kopplung des Oligonukleotids aus Schritt a) an die feste Matrix über eine Modifikation erfolgt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC), eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Oligonukleotid aus
- 15 Schritt a) und/oder b) über einen Loop verfügt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) mit dem Loop an die feste Matrix gekoppelt ist. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, ein Objektträger, ein DNA Chip, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist. Insbesondere bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die feste Matrix
- 20 einen Streptavidinrest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder einen anti-FITC-Antikörper umfasst. Ferner bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Oligonukleotide aus Schritt a) und b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Einzelstrangüberhänge 1, 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die synthetisierte
- 25 Nukleinsäure in einem abschließenden Schritt mit einer replikationsfähigen DNA (einem Plasmidvektor, einer Phagen- oder Virus-DNA, einem artifiziellen Chromosom, einem PCR Produkt oder einer weiteren künstlich hergestellten DNA verknüpft wird. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren zur Herstellung Codon-optimierter offener Leseraster, zur gezielten Mutagenese von Promotoren, Enhancern oder DNAs, welche für Proteine codieren. Insbesondere bevorzugt
- 30 ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure als Codon-optimierte DNA-Vakzine, zur Mutationsanalyse von Proteindomänen, als Matrize für Designerproteine, als Expressionskonstrukt für *in vitro* Proteinsynthese, zur Herstellung von Ribozymen oder

Aptameren, als Sonde zum Nachweis pathogener Mikroorganismen, als Sonde zum Nachweis der Expression von Genen, zum Nachweis allelspezifischer Mutationen, zum Nachweis von Protein/Protein-Bindung, Protein/Peptid-Bindung und/oder der Bindung niedermolekularer Stoffe an Proteine.

5

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch die Bereitstellung eines Kits zur Herstellung einer Nukleinsäure nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, umfassend

- 10 a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- 15 b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem TypIIIS Restriktionsenzym aus a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym aus Schritt a) enthält,
- c) eine feste Matrix,
- 20 d) Reservoirs der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien.

Bevorzugt ist ein Kit, wobei die Enzyme eine Ligase oder Topoisomerase und/oder ein oder mehrere Restriktionsenzym(e) und/oder eine Exonuklease und/oder eine Phosphatase umfassen.

25 Besonders bevorzugt ist ein Automat, welcher nach Eingabe der gewünschten Basensequenz sämtliche Reaktionsschritte fest legen und selbsttätig abarbeiten kann.

Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Figuren erläutert.

30 Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Bio bedeutet eine Modifikation (z.B. Biotin), mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix (z.B. Streptavidin) gekoppelt ist. T, G, C, A und N bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T

Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin und N eine beliebige der vier Nukleinsäurebasen bedeutet.

Figur 2 zeigt schematisch den Aufbau eines EasyPro™ Transkriptions/Translationssystems von PCR-Fragmenten. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. 5'-UTR bedeutet 5'-untranslatierter Bereich. ATG bedeutet Startcodon. 6 x His bedeutet eine sechsmalige Aneinanderreihung von Histidincodons. Single T overhang bedeutet einen Überhang von einem Thymidinrest.

10 Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Minireaktors für die Proteinsynthese.

Figur 4 zeigt eine schematische Darstellung der Produktion einer Peptidlibrary mit dem QuickPep™-Verfahren. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T7 bedeutet T7-Promotor. rbs bedeutet interne Ribosomenbindungsstelle. ATG bedeutet Startcodon. EK bedeutet Enterokinase-Schnittstelle. Peptid ORF bedeutet den offenen Leserahmen des Peptids. STOP bedeutet das Stopcodon. Poly A bezeichnet den poly-A-Schwanz.

Figur 5 zeigt eine schematische Darstellung der Selektion von Ribozymen mit dem RiboSelect™-Verfahren.

Figur 6 zeigt eine schematische Darstellung des Nachweises von Pathogenen nach Anreicherung durch PCR (PathoCheck™). Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist.

25

Figur 7 zeigt eine schematische Darstellung der Identifizierung bekannter Allele durch Ligation markierter Splinker (LIMA™). Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. x bedeutet die Stelle, an der die zu bestimmende Modifikation vorliegt.

30

Figur 8 zeigt eine schematische Darstellung der Parallelanalyse von mRNA-Arrays (PAMINA™).

Figur 9 zeigt die schematische Darstellung eines Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. Esp3I bezeichnet ein Restriktionsenzym.

Figur 10 zeigt die schematische Darstellung eines Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. BpiI bezeichnet ein Restriktionsenzym.

Figur 11 zeigt die schematische Darstellung eines Bipartite-Anchor-Oligonukleotids. Bio bedeutet eine Modifikation, mit der das Anchor-Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt ist. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet.

Figur 12 zeigt die schematische Darstellung eines Splinker-Oligonukleotids. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. BsaI und Eco31I bezeichnen Restriktionsenzyme.

Figur 13 zeigt die schematische Darstellung eines Bipartite-Splinker-Oligonukleotids. T, G, C, A bezeichnen die Nukleinsäurebasen, wobei T Thymidin, G Guanin, C Cytosin, A Adenin bedeutet. BsaI und Eco31I bezeichnen Restriktionsenzyme.

Figur 14 zeigt eine schematische Darstellung des Synthesewegs längerer Nukleinsäuren mit dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die Balken symbolisieren doppelsträngige DNA-Fragmente, welche parallel durch hintereinander geschaltete Ligations/Restriktionszyklen synthetisiert wurden. Im Endprodukt benachbarte Teilabschnitte werden jeweils durch die Ligation eines aufligierten Splinkers mit einem aufligierten Anchor verbunden. Die so gewonnenen größeren Fragmente werden dann im nächsten Schritt wieder entweder mit der Anchor-spezifischen oder der Splinker-spezifischen Restriktionsendonuklease geschnitten und über komplementäre Überhänge miteinander verknüpft usw., so dass sich die Länge der Fragmente mit jedem Schritt

verdoppelt. Die Verknüpfung ist vollkommen sequenzunabhängig, da die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen in den jeweils abgeschnittenen Teilen der aufligierten Fragmente liegen und daher nicht in die wachsende Nukleinsäure eingebaut werden. Die Zahlen über den Balken bedeuten die Größe der Fragmente in Basenpaaren. Ausgehend von 20 Basenpaar großen DNA-Fragmenten ergibt sich somit nach vier Transpositionen eine max. Länge von 320 Basenpaaren, nach fünf Transpositionen eine Länge von 640 Basenpaaren, nach sechs Transpositionen eine Länge von 1280 Basenpaaren, nach sieben Transpositionen eine Länge von 2560 Basenpaaren, usw.

10 Definitionen

Der hier verwendete Begriff "parallel" oder "parallele Synthese" bedeutet, daß verschiedene erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle gleichzeitig in getrennten Reaktionsansätzen synthetisiert werden können, um dann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren z.B. als Anchor oder Splinker zu einem verlängerten Nukleinsäuremoleküle ligiert werden können.

Der hier verwendete Begriff "Sloning" (Sequentielle Ligation von Oligonukleotiden auf Sequenz-unabhängige Weise) bezieht sich auf ein Verfahren zur aufeinanderfolgenden Ligation von Oligonukleotiden mit beliebiger Sequenz.

20

Der hier verwendete Begriff "Anchor" oder "Anchor-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches über eine Modifikation an eine feste Matrix gekoppelt werden kann. Im Sinne der vorliegenden Erfindung enthält das Oligonukleotid in seinem doppelsträngigen Anteil ferner eine Restriktionsschnittstelle für ein TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet.

25

Der hier verwendete Begriff "Splinker" oder "Splinker-Oligonukleotid" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, welches über keine bzw. eine andersgeartete Modifikation verfügt, so daß es nicht selbst an die Matrix bindet, an welche die Anchor-Oligonukleotide gekoppelt sind.

30

Der hier verwendete Begriff "Dumbbell" (auf dt.: Glockenklöppel) bezieht sich auf eine DNA-Struktur, die durch einen Doppelstrang charakterisiert ist, der von zwei Loops flankiert wird.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte:

- a) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypIIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, 5
- b) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt a), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann, 10
- d) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden vorgegebenen Orientierung,
- h) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- i) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIIS Restriktionsenzym, 15 welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet,
- j) Abtrennen des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.

Ein weiteren Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte: 20

- a) bis d) wie oben,
- e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet, 25
- f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt a),
- k) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f).

Ein weiteren Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte: 30

- a) bis g) wie oben,
- h) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypIIIS Restriktionsenzym,

welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet, und gegebenenfalls

- i) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet.

Eines der beiden in jedem Reaktionsschritt zu verknüpfenden Oligonukleotide (das sog. "Anchor"-Oligonukleotid) ist über eine Modifikation, z.B. eine niedermolekulare chemische Verbindung wie Biotin oder Digoxigenin, an eine feste Matrix koppelbar. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um magnetische Streptavidin-beschichtete oder anti-Digoxigenin-beschichtete Beads. Das andere Oligonukleotid (das sog. "Splinker"-Oligonukleotid) besitzt auch ein blockiertes Ende, aber keine derartige oder aber eine andersartige Modifikation. Der Punkt auf den es ankommt ist der, dass die Anchor-Oligonukleotide durch die Bindung an eine geeignete Matrix von den Splinker-Oligonukleotiden getrennt werden können. Es können daher beliebige Verbindungen z.B. Biotin, Digoxigenin, Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Aminoverbindungen, Succinylester und andere dem Fachmann geläufige Verbindungen, verwendet werden, sofern sie geeignet sind, direkt oder indirekt (z.B. über einen Antikörper) eine Bindung an eine feste Phase zu vermitteln.

Anchor-Oligonukleotide können entweder aus einem einzigen zum Teil selbstkomplementären Oligonukleotid bestehen, welches über eine Modifikation vorzugsweise in der Loopsequenz an eine feste Phase koppelbar ist, oder aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche einen Doppelstrang bilden, vorzugsweise mit einem Einzelstrangüberhang. Da nur einer der beiden Stränge an eine Matrix gekoppelt werden muss, kann der andere wenn nötig durch Alkali oder Hitze denaturiert und abgetrennt werden (etwa um als Template für eine PCR-Reaktion zu dienen). Um sicherzugehen, daß auch bei solchen zweigeteilten Anchor-Oligonukleotiden nur ein Ende ligierbar ist, werden die nicht für die Ligation benötigten Enden entsprechend blockiert. Nukleinsäuresequenzen beispielhafter Anchor-Oligonukleotide sind

Anchor A3I

5'-GCTTCGAGACGCGTTTTTCGCGTCTCG-3' (SEQ ID NR:1; FIG. 9)

Anchor A2+

5'-AGAATGGTCTTCGAGCTTTTGCTCGAAGACCA-3' (SEQ ID NR:2; FIG. 10)

Bipartite Anchor

5 5'-CGCGGATCCGCGGCGT-3' (SEQ ID NR:3, FIG. 11)

5'-CGAGACGCCGCGGATCCGCG-3' (SEQ ID NR:4, FIG. 11)

Splinker-Oligonukleotide können entweder aus einem einzigen zum Teil selbstkomplementären Oligonukleotid bestehen oder aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche einen
 10 Doppelstrang bilden, vorzugsweise mit einem Einzelstrangüberhang, d.h. man hat ein mindestens teilweise komplementäres Paar von Oligonukleotiden, wobei die jeweils nicht zu ligierenden Enden der beiden Einzelstränge blockiert sein müssen. Die bevorzugte Einzelstrangüberhangsequenz muss zu dem jeweils zu ligierenden Anchor-Oligonukleotid komplementär sein. Nukleinsäuresequenzen beispielhafter Splinker-Oligonukleotide sind

15

Splinker S1H

5'-AAGCTTCTGGAGACCGCTTTTGCGGTCTCCAGAA-3' (SEQ ID NR:5, FIG. 12)

Bipartite Splinker

20 5'-CTCGAAGCGGAGACCGCCAC-3' (SEQ ID NR:6, FIG. 13)

5'-GTGGCGGTCTCCGCTT-3' (SEQ ID NR:7, FIG. 13)

Sowohl Anchor- wie auch Splinker-Oligonukleotide können Überhänge einer definierten Länge enthalten, in einer bevorzugten Ausführungsform eins bis fünf Nukleotide. Diese Überhänge sind
 25 bei den jeweils zu ligierenden Oligonukleotiden komplementär zueinander, am 5' Ende phosphoryliert und können nur in einer Orientierung miteinander ligiert werden. Dabei entsteht ein ligiertes Oligonukleotid mit z.B. einer sogenannten "Dumbbell"-Struktur. Um eine vollständige Ligation aller verfügbaren Anchor Oligonukleotide zu erreichen, können die anzuligierenden Splinker-Oligonukleotide in 2 bis 10fachem Überschuß zugesetzt werden. Die
 30 überschüssigen, nicht-reagierten Splinker werden nach jedem Ligationsschritt mit Puffer gewegewaschen. Werden z.B. mit Streptavidin beschichtete magnetische Beads verwendet, können die Beads mit den über eine Streptavidin/Biotin-Bindung gebundenen Anchor-

Oligonukleotiden zusammen mit den anligierten Splinkern durch den Einsatz eines Magneten im Reaktionsansatz zurückgehalten werden. Alternativ können z.B. direkt mit Streptavidin beschichtete Wells, Glas(beads), Objektträger, DNA-Chips oder beliebige andere feste Phasen verwendet werden. Beads werden in der Regel bevorzugt, weil sie eine größere Oberfläche und
5 daher eine höhere Bindungskapazität aufweisen.

Um weitere Ligationen durchführen zu können, muss eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease vorhanden sein, die die Nukleinsäuresequenz außerhalb dieser Erkennungssequenz in dem anligierten Splinker-Oligonukleotid schneidet. Beispiele für solche
10 Enzyme sind BpiI, Esp3I, Eco31I, SapI etc. Für das erfindungsgemäße Verfahren nützliche Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen und Schnittstellen sind in der Rebase-Datenbank unter <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html> zu finden. An der in den Splinker-Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstelle werden die Ligationsprodukte so geschnitten, daß ein Teil der Splinkersequenz am Anchor-Oligonukleotid verbleibt. Gleichzeitig
15 wird dadurch ein Sequenzüberhang erzeugt, der für die Ligation eines weiteren Splinker-Oligonukleotids herangezogen werden kann. Der andere abgespaltene Teil und der nicht ligierten Rests des Splinker-Oligonukleotids, das Restriktionsenzym sowie der Restriktionspuffer werden aus dem Reaktionsansatz ausgewaschen, worauf ein weiterer Zyklus beginnt. Der Zyklus kann entweder nur einmal durchgeführt oder aber mehrere Male wiederholt werden, bevor die so
20 verlängerten Oligonukleotide ihrerseits mit den parallel synthetisierten Nachbarfragmenten verknüpft werden. Da die beim Schneiden mit den verschiedenen Restriktionsendonukleasen entstehenden, jeweils zueinander komplementären Überhänge aus dem zu synthetisierenden Gen stammen, die Erkennungssequenzen hingegen in den wieder abgeschnittenen Teilen der Anchor- bzw. Splinker-Oligonukleotide lokalisiert sind, können die benachbarten Fragmente völlig unab-
25 hängig von ihrer Sequenz verknüpft werden. Insbesondere lassen sich dadurch selbst große Gene in vielen parallel ablaufenden Teilreaktionen in nur wenigen Reaktionsschritten zusammen bauen. Im optimalen Fall lässt sich beispielsweise ein 2 kb großes Gen in lediglich 9 Schritten aus 256 Einzelreaktionen zusammen setzen. Ein gleich großes Gen würde bei linearer Synthese (rekursiv, aber nicht parallel) und bei Verwendung von 60mer Oligos mehr als 30 Schritte
30 benötigen. Da sowohl enzymatische als auch chemische Ligationsverfahren Ausbeuten von meist nur 80-90% aufweisen, nimmt die Gesamtausbeute mit der Anzahl der benötigten Reaktionsschritte exponentiell ab, weswegen Verfahren mit wenigen Reaktionsschritten

vorteilhaft sind. Um nicht-umgesetzte Anchor-Oligonukleotide von der weiteren Synthese auszuschließen, kann fakultativ nach der Ligation ein Exonuklease- und/oder Phosphatase-Schritt zwischengeschaltet werden, wodurch der Überhang oder zumindest die für die folgende Ligation erforderliche 5'-Phosphatgruppe entfernt wird. Der Anteil an nicht-umgesetzten Anchor-Oligonukleotiden ist bei einem eingesetzten Überschuß an Splinker-Oligonukleotiden nur gering. Eine Weiterreaktion sollte zudem nur dann möglich sein, wenn dieselbe Sequenz ein weiteres Mal anligiert wird, weswegen die Gefahr einer Kontamination mit nicht oder nur teilweise umgesetzten Anchor Oligonukleotiden als relativ gering anzusehen ist.

- 10 Die so nach mehreren Ligations- und Restriktionszyklen aufligierte Nukleinsäuresequenz kann anschließend durch Schneiden mit einem Restriktionsenzym, das eine Nukleinsäuresequenz in dem ursprünglichen Anchor-Oligonukleotid spezifisch erkennt, von dem an der Matrix verbleibenden Anchor-Oligonukleotid abgetrennt werden. Die aufligierte Nukleinsäuresequenz hängt nun an dem zuletzt anligierten Splinker-Oligonukleotid. Das verlängerte Splinker-
15 Oligonukleotid wird nach Inaktivierung des Restriktionsenzym aus dem ursprünglichen Reaktionsansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit einem aufligierten Anchor-Oligonukleotid verknüpft, das mit einem Splinker-Oligonukleotid spezifischen Restriktionsenzym geschnitten wurde (1. Transposition). Dem Fachmann ist ersichtlich, daß es sich bei den aufligierten Nukleinsäuresequenzen um frei wählbare Sequenzen handeln kann, die sowohl
20 unterschiedlich als auch identisch sein können. Das aus der 1. Transposition resultierende Ligationsprodukt wird wiederum mit einer Anchor-spezifischen Restriktionsendonuklease geschnitten und erneut mit einem analog erhaltenen aufligierten Anchor-Oligonukleotid ligiert (2. Transposition). Auf diese Weise verdoppelt sich die Länge der aufligierten Nukleinsäuresequenzen dann mit jedem weiteren Schritt. Die Verknüpfung der DNA-Fragmente
25 erfolgt jeweils über komplementäre Überhänge, ist aber ansonsten vollkommen sequenzunabhängig. Die einzige Einschränkung dabei ist, daß die Anchor- und Splinker-spezifischen Restriktionsschnittstellen in der zu synthetisierenden Sequenz nicht vorkommen dürfen, weil sonst die DNA auch intern geschnitten werden würde. Jeweils vor einer Spaltung an einer Anchor-spezifischen Restriktionsschnittstelle und der darauf folgenden Transposition kann
30 fakultativ ein Exonukleaseschritt eingeführt werden, um die Transposition nicht vollständig aufligierter Splinker-Oligonukleotide zu verhindern. Die für das Verfahren notwendigen sequenzspezifischen Spaltungen können statt durch TypII S Restriktionsendonukleasen im

Prinzip auch durch analog funktionierende Ribozyme erfolgen.

Ausgehend von einer 20 Basenpaar langen Sequenz (die man für Splinker mit einem 4 nt Überhang durch 5 sukzessive Ligationen der hierfür benötigten Ursprungs-Splinker aus der Bibliothek erhalten kann), lässt sich durch lediglich 7 weitere Ligationsschritte eine doppelsträngige DNA-Sequenz von 2560 Basenpaaren Länge synthetisieren. Bei Zykluszeiten von ca. 1 Stunde kann eine beliebige DNA-Sequenz dieser Länge binnen 12 Stunden synthetisiert werden. Durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen kann der Zeitaufwand auf etwa 6 Stunden halbiert werden.

10

Bei 4 Nukleotide langen Überhängen wird eine Bibliothek von 65536 verschiedenen Splinker-Oligonukleotiden benötigt, um alle möglichen Nukleinsäuresequenzen herstellen zu können. Diese Zahl ergibt sich aus folgender Berechnung: es gibt 256 mögliche 4 Nukleotide lange Überhänge ($4^4 = 256$), ebenso viele Sequenzvarianten existieren für die vier direkt angrenzenden Nukleotide, die den Überhang beim nächsten Ligationsschritt bilden. Insgesamt ergibt sich daraus eine Gesamtzahl von $4^4 \text{ mal } 4^4 = 4^8 = 65536$ Splinker-Oligonukleotide, mit denen sämtliche möglichen Sequenzvarianten dargestellt werden können. Bei 3 Nukleotide langen Überhängen reduziert sich die Komplexität der benötigten Splinkerbibliothek entsprechend auf $4^3 \text{ mal } 4^3 = 4096$, bei zwei Nukleotide langen Überhängen auf $4^2 \text{ mal } 4^2 = 256$, bei 5 Nukleotide langen Überhängen würde sie sich auf $4^5 \text{ mal } 4^5 = 1048576$ erhöhen. Voraussetzung für dieses Baukastensystem ist das Vorhandensein einer kompletten Splinkerbibliothek (für 2 nt Überhänge 256 Oligonukleotide, für 3 nt Überhänge 4096 Oligonukleotide, für 4 nt Überhänge 65536 Oligonukleotide, für 5 nt Überhänge 1048576 Oligonukleotide) sowie einer Anchorbibliothek (4, 16, 64, 256 oder 1024 Oligonukleotide bei 1, 2, 3, 4 oder 5 nt Überhängen). Letztere ist allerdings nicht unbedingt nötig, da die verschiedenen Überhangsequenzen ebenso gut durch einen vorgeschalteten Ligationsschritt mit geeigneten Splinker-Oligonukleotiden erzeugt werden können.

Prinzipiell sind alle Einzelschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens automatisierbar, so daß die Herstellung ganzer Gene so einfach ist wie die Synthese von Oligonukleotiden. Zudem eröffnet sich durch das erfindungsgemäße Verfahren ein Kostensenkungspotential in beträchtlicher Höhe. Erstens können alle benötigten Enzyme großtechnisch hergestellt werden. Zweitens können die

30

Investitionen für die Splinkerlibrary deutlich gesenkt werden, indem die einzelnen Splinker-Oligonukleotide bis auf die letzten 4 Nukleotide des 5'-Überhangs *en bloc* synthetisiert werden. Die Synthesereaktion wird dann in 4 gleiche Teile portioniert; die vier verschiedenen Nukleotide werden dann in separaten Reaktionen an der nächsten (im Endprodukt viertletzten) Position
5 angehängt. Danach werden die vier Einzelreaktionen wiederum geviertelt, wonach das drittletzte Nukleotid angehängt wird usw. Statt 65536 Einzelsynthesen würde man dann nur 256 Synthesen in einem entsprechend größeren und deswegen günstigeren Maßstab benötigen. Ferner können die 256 möglichen 4 Nukleotide langen Überhänge durch eine "blunt end ligation" an 256 verschiedene Anchor-Oligonukleotide, anschließender Exonukleasebehandlung, Waschen und
10 schließlich Restriktion mit der *Anchor*-spezifischen Restriktionsendonuklease erzeugt werden. Auf diese Weise könnten die 65536 benötigten Splinker-Oligonukleotide kostengünstig hergestellt werden. Ferner könnte auf diese Art und Weise eine aufwendige Aufreinigung aller 65536 Splinker-Oligonukleotide umgangen werden, da nichtreaktive Fehlsequenzen durch dieses Verfahren entfernt werden. Da eine extrem hohe Reinheit der eingesetzten Oligonukleotide
15 essentiell für das Gelingen fehlerloser Synthesen ist, müssen diese sowieso entsprechend vorbehandelt werden. Daneben muss eine praktisch vollständige Abwesenheit von Exonukleasen während der Restriktions- und Ligationsschritte gewährleistet sein, damit die Überhangsequenzen intakt bleiben, die für die nachfolgenden Ligationen benötigt werden. Vor allem wenn Exonuklease-Zwischenschritte zur Entfernung nichtligierter Anchor-Oligonukleotide verwendet
20 werden, müssen diese Exonukleasen gründlich gewaschen und/oder inaktiviert werden.

Die Anchor- und Splinker-Oligonukleotide können sowohl jeweils aus einem selbstkomplementären Einzelstrang als auch aus je zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen zusammengesetzt werden. Die Nukleinsäuresequenzen müssen nicht vollständig komplementär
25 sein; die selbstkomplementären Einzelstrang-Oligonukleotide können einen Loop aufweisen und die komplementären Plus- und Minus-Stränge können nur teilweise komplementär sein. Bei Anchor- und Splinker-Oligonukleotiden, die aus je zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen zusammengesetzt sind, muss (i) die Schmelztemperatur des Doppelstranghybrids genügend hoch sein, um eine Denaturierung der zusammengesetzten Anchor- und Splinker-
30 Oligonukleotide und einen möglicherweise daraus resultierenden unbeabsichtigten Transfer der nicht an eine Festphase gekoppelten Einzelstränge zu verhindern und müssen (ii) die jeweils nicht zu verlängernden Enden durch geeignete Modifikationen blockiert sein. Oligonukleotide

aus zwei komplementären Plus- und Minus-Strängen besitzen gegenüber Oligonukleotiden aus einem selbstkomplementären Einzelstrang bestimmte Vorteile. Selbstkomplementäre (Snap back) Oligonukleotide verursachen bei der Aufreinigung oft gewisse Schwierigkeiten, da sie in hoher Konzentration eine Tendenz zur Bildung von Netzwerken haben. Einzelsträngige Teil-

5 oligonukleotide sind auch kürzer und dadurch mit geringerem Aufwand in höherer Reinheit zu gewinnen. Für bestimmte erfindungsgemäße Ausführungsformen werden aus zwei Teil-

oligonukleotiden zusammengesetzte ("bi-partite") Anchor-Oligonukleotide verwendet.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Anchor bzw. Splinker die folgenden

10 Kombinationen an Erkennungssequenzen:

Anchor	Splinker
CGTCTCN [^] NNNN_ (Esp3I, BsmBI)	GGTCTCN [^] NNNN_ (BsaI, Eco31I,..)
GGTCTCN [^] NNNN_ (BsaI, Eco31I,..)	CGTCTCN [^] NNNN_ (Esp3I, BsmBI)
GAAGACNN [^] NNNN_ (BbsI, BpiI...)	ACCTGCNNNN [^] NNNN_ (BspMI, Acc36I)
ACCTGCNNNN [^] NNNN_ (BspMI, Acc36I)	GAAGACNN [^] NNNN_ (BbsI, BpiI...)
GCAGTG_NN [^] (BtsI)	GCAATG_NN [^] (BsrDI, Bse3DI, ..)
GCAATG_NN [^] (BsrDI, Bse3DI, ..)	GCAGTG_NN [^] (BtsI)
GTATCCNNNNN_N [^] (BciVI, BfuI)	ACTGGGNNNN_N [^] (BfiI, BmrI)
ACTGGGNNNN_N [^] (BfiI, BmrI)	GTATCCNNNNN_N [^] (BciVI, BfuI)

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Herstellung der Nukleinsäure nach dem erfindungsgemäßen Verfahren. Das Kit kann aus einer Bibliothek aller notwendigen

15 Anchor- und Splinker-Oligonukleotide, ferner einer festen Phase, an welche die Anchor-Oligonukleotide gekoppelt werden können, vorzugsweise magnetisierte Beads, geeigneten Reaktionsbehältnissen, Ligase, gegebenenfalls einer Topoisomerase und/oder einer 3'-5'-Exonuklease und/oder Phosphatase, mindestens zwei verschiedenen TypII-Restriktionsendonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, sowie aller

20 benötigten Reaktionspuffer bestehen. Bevorzugt ist fernerhin eine Pipettierstation mit einem kühlbaren Probenvorratsbehälter mit einer entsprechenden Softwaresteuerung, die sämtliche Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens automatisch durchführt

Die vorliegende Erfindung erlaubt eine komplette Automatisierung des gesamten Gensyntheseprozesses durch die Bereitstellung von einer Bibliothek immer wieder zu benützender,

25

mindestens teilweise doppelsträngiger hochreiner Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für bestimmte TypIIIS Restriktionsendonukleasen (sogenannte "Outside Cutter"). Die Automatisierung wird ferner erlaubt durch die Bereitstellung eines Verfahrens, welche die parallele Synthese von Genfragmenten und deren sequenzunabhängige Verknüpfung an jeder beliebigen Stelle erlaubt sowie aufgrund einer orientierungsgebundenen Verlängerung der Startmoleküle über deren Bindung an eine Festphase (die nicht zu ligierenden Enden sind durch geeignete Modifikationen bzw. Loopsequenzen blockiert) und eines definierten Sets rekursiver Prozeduren (Ligations-, Wasch- und Restriktionsschritte), die durch einen Roboter abgearbeitet werden können.

10

Nachstehend werden bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung beispielhaft wiedergegeben, die auf der Komplettsynthese ganzer Gene durch das erfindungsgemäße Verfahren beruhen.

1. Herstellung einer cDNA, wenn nur die Proteinsequenz bekannt ist

Es kommt häufig vor, daß nur die Aminosäuresequenz oder Teile der Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt sind, jedoch nicht die cDNA oder genomische Sequenz. Wegen der Degeneration des genetischen Codes ist es in der Regel nicht möglich, das entsprechende Gen direkt über eine PCR einer geeigneten cDNA-Bank zu amplifizieren. Man sucht daher Regionen, in denen Aminosäuren wie Tryptophan, Methionin bzw. Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Tyrosin, Phenylalanin, Cystein oder Lysin gehäuft auftreten, da es für diese Aminosäuren nur ein bzw. zwei Codons gibt. Sofern es gelingt, mit niedrig degenerierten Primern ein PCR-Fragment der erwarteten Größe zu erhalten, wird dieses als Sonde benutzt, um das dazugehörige Gen aus einer cDNA-Bank zu klonieren. Diese Arbeit wird zwar heutzutage durch die Verfügbarkeit von Gene-Arrays und Klonkollektionen in vielen Fällen wesentlich erleichtert, doch zum einen stehen solche Hilfsmittel nur für eine begrenzte Anzahl von Organismen und Zelltypen zur Verfügung, zum anderen ist selbst bei Vorliegen der kompletten cDNA meist noch eine Umklonierung in einen geeigneten Expressionsvektor erforderlich. Der Zeitaufwand kann je nach Schwierigkeit des Projekts bei ein bis zwei Wochen, in Extremfällen aber durchaus auch bei mehreren Monaten bis Jahren liegen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ausgehend von einer bekannten Proteinsequenz ein Expressionskonstrukt mit einem für den gewünschten Organismus optimierten Codon Usage in ein bis zwei Tagen hergestellt werden. Hierfür muss der Organismus, in dem das Protein natürlicherweise exprimiert wird, gar nicht zur Verfügung

stehen, da die DNA-Sequenz aus der bekannten Proteinsequenz abgeleitet werden kann, ohne daß ein Template vorliegen muss. Mit verbesserten Proteinsequenzierungsmethoden wird es in Zukunft möglich sein, Proteine mit interessanten Enzymaktivitäten aus beliebigen Organismen zu sequenzieren und ohne den Umweg über die cDNA-Klonierung mittels des
5 erfindungsgemäßen Verfahrens direkt in jedes gewünschte Expressionssystem zu überführen.

2. Herstellung von Designergenen und Designerproteinen

Eine weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die einfache Herstellung von Designergenen bzw. Designerproteinen, d.h. die Kopplung funktioneller Domänen verschiedener Proteine, um
10 beispielsweise Enzyme mit neuen oder veränderten Eigenschaften herzustellen. Bei Kenntnis der Röntgenkristallstruktur eines Proteins können dann sehr gezielte Veränderungen wie z.B. die Einfügung definierter Linkerdomänen oder ein Redesign einer Bindungstasche vorgenommen werden, um neue Funktionen oder veränderte Spezifitäten in Proteine einzuführen. Durch zielgerichtetes Proteindesign kann man beispielsweise regulierbare katalytische Zentren
15 konstruieren, die durch eine Konformationsänderung des Proteins infolge der Bindung eines spezifischen Liganden aktiviert werden. Auf diese Weise können Designerproteine hergestellt werden, die z.B. auf die Bindung eines bestimmten Virusproteins hin eine Caspase-Aktivität entfalten, die dann in infizierten Zellen Apoptose auslöst. Erste Versionen solcher hochspezifischen Pharmaka sind bereits beschrieben worden; vgl. Vocero-Akbani A.M., Heyden
20 N.V., Lissy N.A., Ratner L., Dowdy S.F., Nat Med, 1999 Jan, 5:1, 29-33. Weiterhin können Proteine dadurch stabilisiert werden, daß an bestimmten Positionen Aminosäuren eingebaut werden, die zusätzliche Salzbrücken bilden können. Somit kann die Toleranz gegenüber hohen Temperaturen verbessert werden, was unter anderem für die Waschmittelindustrie vorteilhaft ist. Sofern die Domänstrukturen bekannt sind, kann durch die punktgenaue Expression bestimmter
25 funktioneller Regionen eine gewünschte enzymatische Aktivität von einer unerwünschten getrennt werden. Ebenso lassen sich Multienzymkomplexe konstruieren, die eine ganze Reihe verschiedener Reaktionen katalysieren können. Dadurch lassen sich Verbesserungen bei der Synthese vieler organischer Verbindungen erreichen oder manche Synthesen sogar erst ermöglichen. Dies eröffnet ganz neue Perspektiven, da viele organische Synthesen, bei denen
30 heute noch umweltgefährdende Lösungsmittel und Katalysatoren eingesetzt werden müssen, in Zukunft durch solche maßgeschneiderten Biokatalysatoren ersetzt werden können.

3. Systematische Mutagenese als Ersatz für randomisierte Mutagenisierung

Eine häufig vorkommende Aufgabe in der biochemisch orientierten Molekularbiologie besteht darin, aus vielen Proteinvarianten diejenige herauszusuchen, die die höchste enzymatische Aktivität oder die stärkste Bindung an ein Substrat oder ein anderes Protein aufweist. Man geht dann meist so vor, daß man eine Reihe von zufälligen Mutationen von einer oder mehreren Aminosäuren einführt und die entstehenden Varianten in einem geeigneten Screening-Verfahren analysiert. Zwar ist es prinzipiell auch möglich, alle Mutanten separat herzustellen, jedoch wird dies aus Zeit- und Kostengründen selten durchgeführt. Bei einer randomisierten Mutagenisierung ist die Kontrolle über die entstehenden Mutanten naturgemäß sehr limitiert, zum einen da bestimmte Aminosäuresubstitutionen verfahrensbedingt häufiger gefunden werden als andere, zum anderen, da es sich kaum vermeiden lässt, daß bei diesem Verfahren auch Stopcodons eingeführt werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich hingegen alle gewünschten Mutanten gezielt und ohne großen Aufwand darstellen und als Proteine exprimieren.

15

4. Herstellung synthetischer Gene, insbesondere zum Einsatz als DNA-Vakzine

In vielen Fällen ist es wünschenswert, die Proteinexpression bestimmter Gene in heterologen Systemen zu optimieren. Dies kann durch die Verwendung starker Promotoren sehr häufig nur zum Teil erreicht werden. Je nachdem, welcher Organismus für die Expression verwendet wird, kann sich die Verwendung bestimmter Codons für eine Aminosäure vorteilhaft oder nachteilhaft auf die erreichbare Genexpression auswirken. So sind beispielsweise viele retrovirale Genprodukte in eukaryotischen Zellen nur schlecht translatierbar, da sie meist sehr AT-reich sind und in höheren Eukaryonten seltene Codons benutzen. Speziell für den Einsatz solcher Gensequenzen als DNA-Vakzine ist es daher von großem Vorteil, wenn deren Codongebrauch für Säugerzellen optimiert ist. Desgleichen können bestimmte RNA-Strukturen zu einer Instabilität der Transkripte führen, was die Genexpression ebenfalls negativ beeinflussen kann. Solche Elemente können durch Codonveränderungen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls leicht ausgeschaltet werden.

30 5. Analyse von Proteindomänen durch Deletions- oder Punktmutagenese

Die Analyse von Mutanten ist sehr oft das Mittel der Wahl bei der funktionellen Charakterisierung von Proteinen. Zwar existiert sowohl für die Herstellung von Deletions- wie auch

Punktmutanten eine Reihe etablierter Verfahren, jedoch sind diese in der Regel sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Deletionen werden meist durch Einführen von Linkersequenzen oder durch eine PCR mit Primern, deren Enden zu verschiedenen Teilsequenzen komplementär sind, hergestellt. Um eine ganze Serie definierter Deletionen zu erhalten, ist häufig ein
5 Zweischrittverfahren notwendig, bei dem zunächst bestimmte Restriktionsschnittstellen eingeführt werden, über welche dann die gewünschten Deletionen eingeführt werden können. Mit entsprechend konzipierten Primern und einer Mehrfragmentligation lassen sich solche Deletionen zwar im Prinzip auch in einem Schritt herstellen, jedoch sind die Erfolgsaussichten dabei eher gering. In allen diesen Fällen muss die Wildtyp-DNA als Template vorliegen, was bei
10 dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig ist. Darüber hinaus können Deletionsmutanten hergestellt werden, da es gar nicht notwendig ist, Restriktionsschnittstellen einzuführen, für die man erst geeignete Stellen finden muss, damit die eingeführten Mutationen keine Veränderungen in der Proteinsequenz bewirken (sogenannte "Silent site" Mutationen). Auch die Herstellung von Doppel- oder Tripletmutanten ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren
15 möglich. Für die funktionelle Kartierung eines Proteins können in dessen Gensequenz mittels der erwähnten "Silent site" Mutationen gleichzeitig auch Restriktionsschnittstellen für eine große Anzahl verschiedener Restriktionsendonukleasen eingeführt werden, mit deren Hilfe beliebige Deletionen hergestellt werden können. In vielen Fällen wird daher die klassische Mutationsanalyse verzichtbar und kann durch das schnellere und genauere erfindungsgemäße Verfahren
20 ersetzt werden.

6. Gekoppelte in vitro Transkriptions/Translationssysteme ("EasyPro™")

Gekoppelte in vitro Transkriptions/Translationssysteme werden zur schnellen Synthese von Proteinen im analytischen Maßstab eingesetzt, z.B. für Bindungsstudien oder
25 Kopräzipitationsassays. Hierfür werden die zu exprimierenden Sequenzen in einen Vektor kloniert, der einen Promoter für eine RNA-Polymerase enthält. Mit Hilfe dieser Polymerase wird mRNA transkribiert, die in einem RNA-depletierten Weizenkeim- oder Retikulozytenextrakt in das gewünschte Protein translatiert wird, das aufgrund der geringen Ausbeute und der einfacheren Nachweisbarkeit meist mit ³⁵S-Methionin oder Cystein radioaktiv markiert ist. Eine
30 noch schnellere Alternative ist das auf dem erfindungsgemäßen Verfahren basierende EasyPro™-System. In einem Anchor-Oligonukleotid, welches einen T7 (SP6) Promoter, eine interne Ribosomenbindungsstelle sowie ein Hexahistidin-Tag enthält, wird durch Restriktion mit

XcmI ein einzelner Thymidinüberhang erzeugt, der direkt mit einem PCR-Produkt ligiert werden kann. Drei EasyPro™-Anchor-Oligonukleotide mit verschiedenen Leserastern sind ausreichend, um alle in der richtigen Orientierung ligierten PCR-Fragmente zu translatieren. Mittels terminaler Transferase oder durch Ligation eines entsprechenden Splinker-Oligonukleotids an das 3'-Ende des PCR-Produkts kann man zudem leicht einen künstlichen poly-A-Schwanz in das DNA-Template einführen, welcher das RNA-Transkript stabilisiert und dadurch für eine höhere Translationseffizienz sorgt. Ferner können die für das gewünschte Protein codierenden DNA-Sequenzen nach Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease auch direkt an einen modifizierten EasyPro™-Anchor mit einem passenden 4 nt langen Überhang ligiert werden.

10

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Minireaktors zur schnellen Synthese von Proteinen. In der unteren Reaktionskammer des Minireaktors findet die Transkription der an Streptavidin-beschichtete Beads gekoppelten Expressions-Anchor-Nukleinsäuresequenz statt. Die dabei entstehenden mRNAs werden über ihren 3'-poly-A-Schwanz an Oligo-dT gekoppelte Beads gebunden, welche sich ebenfalls in der unteren Reaktionskammer befinden. Dort läuft auch die Translation der mRNAs in einem Retikulozytenextrakt ab. Diese Kammer wird durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO (Molekulargewichtsausschluss) von ca. 200 kD von einer darüber liegenden zweiten Kammer abgetrennt. Diese enthält Beads, welche das Protein von Interesse binden können (z.B. Ni²⁺-NTA-Beads für Proteine mit einem Hexahistidin-Tag). Durch eine kontinuierliche Zufuhr von Pufferlösung mit frischen niedermolekularen Reaktanden (Aminoacyl-tRNAs, Ribonukleotidtriphosphate, CAP-Analogen und Creatinphosphat) wird die Produktion über längere Zeit hinweg aufrechterhalten. Gleichzeitig wird dadurch das synthetisierte Protein aus der unteren in die obere Reaktionskammer gedrückt, wo es an den Beads hängen bleibt. Alternativ kann diese Kammer durch eine weitere Ultrafiltrationsmembran abgeschlossen werden, deren Ausschluß so gewählt ist, daß sie für Puffer und kleinere Moleküle, nicht aber für das gewünschte Protein permeabel ist. Dieses sammelt sich daher in der oberen Kammer an und kann von dort in aufgereinigter Form isoliert werden. Die dabei erzielbaren Ausbeuten sind nicht nur für die meisten analytischen Experimente ausreichend, sondern können sogar Proteinexpressionsexperimente im kleinen Maßstab ersetzen. Wenn es beispielsweise darum geht, die spezifische enzymatische Aktivität verschiedener Proteinmutanten zu bestimmen, mussten diese hierfür bislang in aufwendigen Vorversuchen kloniert, exprimiert und aufgereinigt

30

werden. Da praktisch alle diese Schritte in dem erfindungsgemäßen EasyPro™-Verfahren bereits integriert sind, wird dadurch ein erheblicher Zeitvorteil gegenüber konventionellen Methoden erreicht.

- 5 Mit einer Modifikation des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens können einfach und kostengünstig Peptidbibliotheken hergestellt werden, welche unter anderem zum Epitopmapping von Antikörpern oder zur Identifizierung immunogener Epitope in Proteinen von Viren, Bakterien oder Pilzen benötigt werden (zur schnellen Etablierung serologischer Nachweissysteme). Hierfür werden modifizierte EasyPro™-Anchor-Oligonukleotide sukzessive
- 10 durch Splinkerligationen verlängert, so daß die für die gewünschten Peptide codierenden Sequenzen entstehen. Im letzten Schritt wird ein vorgefertigter Endsplinker anligiert, welcher für ein C-terminales Tag, ein Stopcodon sowie einen Poly-A-Schwanz codiert. Die Ligationsprodukte werden in dem beschriebenen Minireaktor transkribiert und translatiert. Die fertigen Peptide werden nach Abschluss der Translation und mehreren Waschschritten mit einer
- 15 spezifischen Protease, z.B. Enterokinase oder Faktor Xa, an der vom EasyPro™-Anchor-Oligonukleotid codierten Schnittstelle abgespalten und aus der oberen Reaktionskammer ausgewaschen. Mit Hilfe des C-terminalen Tags können diese an eine feste Phase für nachfolgende Tests gebunden werden. Die Peptide liegen zudem schon in aufgereinigter Form vor und können direkt für nachfolgende Applikationen eingesetzt werden. Da jeweils das gleiche
- 20 Anchor-Oligonukleotid verwendet wird und die benötigten Splinker-Oligonukleotide aus einem bereits vorgefertigten Teilstück in wenigen Schritten aufligiert werden können, sind die anfallenden Kosten geringer als bei einer konventionellen Peptidsynthese.

7. Herstellung von Ribozymen oder Aptameren

- 25 Analog zu der oben beschriebenen Proteinsynthese lassen sich Anchor-Oligonukleotide mit einem T7 (SP6) Promoter auch zur Herstellung und Mutagenisierung von RNAs verwenden. Das System eignet sich insbesondere zur Synthese verschiedener Ribozyme, da die für die Ribozyme codierenden DNA-Sequenzen auf einem verlängerten Splinker-Oligonukleotid an ein Promotormodul auf einem Anchor-Oligonukleotid anligiert werden können. Vor allem können
- 30 genau definierte Ribozymtemplatebibliotheken erstellt werden, die sich per PCR leicht amplifizieren lassen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Ribozymtemplatesequenzen auf das Nukleotid genau hergestellt werden, ohne daß hierfür

Klonierungsarbeiten notwendig sind. Durch Einführung von Linksequenzen kann man Ribozyme herstellen, die sich über eine zur Linksequenz komplementäre DNA/RNA an eine beliebige chemische Verbindung wie Peptide, Nukleinsäuren, aliphatische Kohlenwasserstoffe, Ester, Ether oder Alkohole koppeln lassen. Wenn diese Verbindung an eine feste Phase gebunden vorliegt, lassen sich Ribozyme selektionieren, die diese Bindung spalten. Diejenigen Ribozyme, die sich selbst von der Bindung an die feste Phase "befreit" haben, können durch reverse Transkription und nachfolgende asymmetrische PCR in einzelsträngige DNA-Moleküle überführt werden. Diese werden dann über die Linksequenz an ein entsprechend modifiziertes Anchor-Oligonukleotid hybridisiert und ligiert. Das verwendete Anchor-Oligonukleotid ist so konstruiert, daß es einen T7-Promoter enthält, über den mit Hilfe der T7-Polymerase wieder das Ribozym erhalten werden kann. Durch die Verwendung einer ungenauen Reversen Transkriptase (z.B. HIV RT) lassen sich zufällige Mutationen einführen. Der Selektionsdruck kann durch immer kürzere Inkubationen erhöht werden, so daß präferentiell Ribozyme mit einer hohen Aktivität amplifiziert werden. Analog lassen sich nach demselben Prinzip auch Ribozyme mit der Fähigkeit selektionieren, eine Bindung zur festen Phase zu vermitteln.

8. Verwendung von mit dem erfindungsgemäßen Verfahren produzierten ssDNAs in der Diagnostik (PathoCheck™)

Bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten wird üblicherweise häufig ein direkter Erregernachweis z.B. durch PCR verlangt. Besonders in der Transfusionsmedizin ist es wichtig, kontaminierte Blutproben sicher zu erkennen und auszusortieren. Die hierfür üblicherweise eingesetzten serologischen Assays können dies nur dann gewährleisten, wenn die Infektion des Spenders bereits einige Zeit zurückliegt, so daß bereits Antikörper gebildet worden sind. Während eines Fensters von bis zu 12 Wochen (in Extremfällen auch länger) sind beispielsweise bei der HIV-Infektion noch keine Antikörper im Blut nachweisbar, obwohl bereits eine massive Virusreplikation stattfindet. Da eine routinemäßige PCR-Untersuchung aller Proben aus Kostengründen vielerorts kaum machbar ist, wird diese (wenn überhaupt) an Pools von Einzelspenden durchgeführt. Die Problematik dabei ist, daß dadurch die an sich sehr hohe Sensitivität sinkt, da die Menge des für die Analyse eingesetzten Materials nicht beliebig erhöht werden kann. Bei Viruserkrankungen wie HIV, bei denen ein Großteil der Viren extrazellulär vorliegt, kann dies durch eine Konzentrierung der Viren durch Zentrifugation noch einigermaßen ausgeglichen werden, bei vorwiegend zellassozierten Viren funktioniert das allerdings meist

weniger gut. Man kann zwar zunächst DNA oder RNA aus den Blutzellen isolieren, jedoch nur einen Bruchteil davon in der PCR-Reaktion einsetzen, da sonst unspezifische PCR-Produkte überhandnehmen. Daher muss in solchen Fällen eine Vorselektion des zu amplifizierenden Materials durchgeführt werden. Hierfür wird ein einzelsträngiges, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestelltes Produkt eingesetzt, das mit einem modifizierten Anchor-Oligonukleotid hergestellt wird. In diesem Fall verwendet man ein Anchor-Oligonukleotid aus zwei getrennten komplementären Strängen, von denen der eine am 5'-Ende modifiziert, z.B. biotinyliert, ist, der andere am 3'-Ende blockiert ist. Nach der Synthese der Virus-Sequenz wird der nicht-biotinylierte Strang durch Waschen mit einer denaturierenden Lösung abgetrennt, so daß eine einzelsträngige Antisense-DNA verbleibt. Diese kann mit dem 5'-biotinylierten Teil-Ancor-Oligonukleotid und einem endständigen Oligonukleotid amplifiziert werden, sofern mehr Material benötigt wird. Von diesem PCR-Produkt ist nur ein Strang biotinyliert, der andere kann durch Denaturierung abgetrennt werden. Diese Antisense-DNA kann nun dafür eingesetzt werden, um virale RNAs oder DNAs aus einem komplexen Gemisch wie einem Zelllysate oder einer Nukleinsäurepräparation anzureichern, indem man diese miteinander hybridisiert, die Hybride an einen Streptavidin-beschichteten Träger (Support) bindet und nicht-hybridisierte Komponenten unter stringenten Bedingungen gewäscht. In einem zweiten Schritt können die angereicherten RNAs oder DNAs dann mit einer konventionellen PCR mit Primern aus dem nicht-hybridisierten Teil der RNA oder DNA amplifiziert und nachgewiesen werden. Dies kann üblicherweise über Gelelektrophorese der Produkte geschehen oder durch Fluoreszenzanalyse oder durch einen nachgeschalteten ELISA, unter der Voraussetzung, daß ein entsprechend modifizierter Primer verwendet wurde. Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind, daß fast beliebig hohe Mengen an Ausgangsmaterial eingesetzt werden können, was die Sensitivität der Analyse verbessert, daß auch mehrere Targets gleichzeitig untersucht und bei Verwendung verschieden fluoreszenzmarkierter Primer auch differenziert werden können und daß es für beliebige Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Viren einsetzbar ist. Durch die Voranreicherung der zu amplifizierenden Sequenzen werden nebenbei auch Hintergrundprobleme deutlich reduziert. Bei entsprechender Miniaturisierung kann eine große Anzahl verschiedener Pathogene gleichzeitig auf einem Chip getestet werden, wodurch die Analysekosten extrem gesenkt werden können.

9. "Gene Profiling" (GPro™)

In der molekularbiologischen Forschung und zunehmend auch in der molekularen Diagnostik wird die Expression bestimmter Gene auf der RNA-Ebene quantitativ untersucht. Standardwerkzeuge hierfür sind der Northern-Blot, das S1-Mapping oder der "Ribonuclease Protection Assay" (RPA), meist in Verbindung mit radioaktiv markierten Sonden. Die vorstehend beschriebenen einzelsträngigen DNAs können auch für diese Aufgabe verwendet werden. Eine vorhergehende Aufreinigung der zu analysierenden RNAs, die meist eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt, ist hierzu nicht notwendig. Ähnlich wie bei dem erfindungsgemäßen PathoCheckTM-Verfahren werden die zu untersuchenden mRNAs mit einem Überschuss eines modifizierten z.B. biotinylierten Anchor-Oligonukleotids mit genspezifischen einzelsträngigen Antisense-DNAs hybridisiert und an einer z.B. Streptavidin-beschichteten festen Phase immobilisiert. Nach dem Auswaschen aller Proteine, nicht relevanter Nukleinsäuren und sonstiger Verunreinigungen werden die Ziel-mRNAs mit einer Reihe von direkt oder indirekt fluoreszenzmarkierten Splinkersequenzen, welche zu einem anderen Teil dieser mRNAs komplementär sind, nachgewiesen. Durch die Verwendung verschiedener genspezifischer Antisense-DNAs und unterschiedlich markierter Nachweissplinker-Oligonukleotide kann die Expression mehrerer Gene gleichzeitig analysiert werden. Das ganze Verfahren lässt sich ohne großen Aufwand vollständig automatisieren. Sofern die zu analysierenden Gewebe nicht übermäßig viel RNase enthalten, reicht eine Lyse in chaotropen Puffern und/oder Zugabe von RNasin aus, die Integrität der RNAs zu gewährleisten. Wenn maximale Sensitivität wichtiger ist als der gleichzeitige Nachweis verschiedener mRNAs in einem Reaktionsansatz, können anstelle der fluoreszenzbasierten Nachweisreagenzien auch Antikörper eingesetzt werden, welche an ein polyvalentes Sekundärreagenz binden wie ein anti-Maus-Ig-Peroxidase-Polymer. Diese Komplexe werden dann in einer nachgeschalteten Enzymreaktion detektiert z.B. durch die beim Umsetzen eines geeigneten Substrats entstehende Chemilumineszenz. Für besonders häufig gemachte Untersuchungen können entsprechende GProTM-Kits mit synthetischen Kontroll-mRNAs als quantitative Standards bereits fertig konfektioniert werden.

10. Allelidentifizierung durch hybridvermittelte Ligation (LIMATM; Ligation mediated Identification of Mutant Alleles)

Besonders in der Pränataldiagnostik von Erbkrankheiten, aber auch zur Bestimmung der individuellen Sensitivität gegenüber verschiedenen Arzneimitteln muss der Genotyp bestimmter Allele festgestellt werden. In der Regel geschieht dies durch eine PCR-Amplifikation des zu

untersuchenden Locus aus der genomischen DNA und anschließende Restriktionsanalyse oder Sequenzierung. Im ersten Fall bedingt dies eine gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente, die nicht ohne weiteres automatisierbar ist. Das trifft auch im zweiten Fall zu, sofern nicht mit der Chipsequenzierungsmethode gearbeitet wird, die jedoch noch nicht ausgereift ist. Auch für diesen Aspekt lassen sich erfindungsgemäß hergestellte DNA-Fragmente verwenden. Voraussetzung hierfür ist, daß es sich um bekannte, molekular identifizierte Allele handeln muss. Ein erfindungsgemäß hergestelltes Anchor-Oligonukleotid wird dann so konstruiert, daß es an eine Genregion hybridisiert, die unmittelbar vor der Mutation liegt. Ein weiteres Oligonukleotid, das ein oder mehrere fluoreszierende Markierungen enthält, hybridisiert an die direkt angrenzende 3'-Region des Gens, so daß die beiden freien Enden der erfindungsgemäß hergestellten Anchor-Oligonukleotid-DNA und des fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids bei durchgängiger Hybridbildung direkt nebeneinander zu liegen kommen und miteinander ligiert werden können. Sofern die Sequenz an dieser Stelle abweicht, kommt es nicht zur Anlagerung der Enden und damit auch nicht zur Ligation. Stattdessen kann z.B. ein mit einer anderen Fluoreszenz markiertes Oligonukleotid an die entsprechende mutierte Sequenz binden, wodurch eine andere Markierung an den biotinylierten Anchor ligiert wird. Durch Laseranregung werden die jeweils gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe und damit die jeweiligen Allele identifiziert. Zur Erhöhung der Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch in diesem Fall eine asymmetrische PCR vorgeschaltet werden, welche den zu untersuchenden Locus amplifiziert. Bei einheitlichen Reaktionsbedingungen für die PCR und Hybridisierung ist es möglich, mehrere verschiedene Allele gleichzeitig aus einer Probe zu bestimmen.

11. Direkte Interaktionsanalyse von Protein Arrays (LISPA™)

Mit dem Erfolg des "Human Genome Project" steht als eine der nächsten Aufgaben die Klassifizierung der ca. 50.000 menschlichen Gene an. Nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in dem sich rasch fortentwickelnden Gebiet der molekularen Medizin ist es wichtig zu verstehen, was diese Gene tun, wie sie in welchen Situationen miteinander kooperieren, welche Proteine, Peptide oder niedermolekularen Stoffe an welche anderen Proteine binden etc. Ein erster Anhaltspunkt für solche Kooperationen zwischen Proteinen ist meist ein direkter physischer Kontakt der jeweiligen Genprodukte. Um solche Bindungen in vitro auf der Proteinebene untersuchen zu können, benötigt man in der Regel aufgereinigte Proteinpräparationen. Bei 50.000 Proteinen ist dies jedoch nicht ohne weiteres möglich. Man behilft

sich daher zumeist mit genetischen Methoden wie z.B. dem sogenannten "Yeast Two Hybrid Screen", um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. So erfolgreich diese Methode bisher auch eingesetzt worden ist, ist sie dennoch extrem artefaktanfällig, umständlich und für die Komplexität der nun anstehenden Aufgabe ungeeignet. Diese Aufgabe kann mit einer Kombination des erfindungsgemäßen Verfahrens, des SloningTM-Verfahrens, und dem erfindungsgemäßen EasyProTM-Verfahren in Verbindung mit einem Biochip durchgeführt werden. Mittels einer Automatisierung können die kompletten 50.000 Gene synthetisiert, exprimiert und mit einem geeigneten Tag zur Immobilisierung in Reaktionskammern eines Biochips versehen werden. Für Bindungsstudien mit einem fluoreszenzmarkierten Protein oder einer niedermolekularen chemischen Verbindung ist eine Menge von 10^7 bis 10^8 Molekülen üblicherweise ausreichend. In Kavitäten von $100 \times 200 \times 60 \mu\text{m}$ können etwa 1 Nanoliter einer Proteinlösung deponiert werden, dies entspricht bei einem 100 kD Protein und einer Konzentration von 5 mg/ml ca. 3×10^{10} Molekülen. Geht man davon aus, daß die tatsächliche Bindungskapazität pro Kavität bei ca. 1% dieses Werts liegt, ist auch bei relativ großen Proteinen noch ausreichend Material vorhanden. Wenn die einzelnen Kavitäten ca. $30 \mu\text{m}$ auseinanderliegen, so könnte die gesamte Bibliothek von 50.000 Proteinen auf einem Chip von nur 20 cm^2 untergebracht werden. Ein Laser mißt die Fluoreszenz in sämtlichen Kavitäten vor und nach der Bindung des fluoreszenzmarkierten Zielmoleküls, woraus man die Stärke der Interaktion berechnet. Kavitäten, in denen nur das Tag präsentiert wird, dienen als unspezifische Kontrolle. Mit Hilfe solcher Proteinarrays lassen sich beispielsweise bislang nicht feststellbare Bindungen von Arzneimitteln an zelluläre Proteine detektieren oder auch komplizierte Signaltransduktionskaskaden nachvollziehen.

12. Parallele Analyse von mRNAs mit immobilisierten Nukleinsäure Arrays (PAMINATM)

Einer der Schwerpunkte der modernen Arzneimittelforschung besteht in dem gezielten Eingriff in die Expression einzelner Gene. Dazu muss der Einfluss von neuen Wirkstoffen auf die Expression anderer Gene möglichst umfassend untersucht werden. Bei Signalübertragungsprozessen, der Zelldifferenzierung oder bei krankheitsinduzierten metabolischen Veränderungen wird oft eine ganze Kaskade verschiedener Gene an- oder abgeschaltet. Aufgrund der Komplexität der Genexpression in höheren Organismen ist es aber bis jetzt praktisch nicht möglich, mehr als eine Handvoll Gene gleichzeitig zu analysieren. Mit der

Sequenzierung des menschlichen Genoms werden in Zukunft jedoch die Grundvoraussetzungen für eine umfassende parallele Analyse der gesamten Genexpression einer Zelle geschaffen werden. Aus den vorliegenden Sequenzinformationen lassen sich durch computerisierte Sequenzvergleiche zunächst die Regionen in den einzelnen Genen identifizieren, die die geringste Homologie untereinander aufweisen, also den höchsten Grad an Spezifität für das jeweilige Gen. Aus diesen Genabschnitten können genspezifische, einzelsträngige Antisense-Anchor-DNAs abgeleitet werden, die in einem Array auf einem Biochip immobilisiert werden. Die Antisense-Anchor-DNAs können so konzipiert werden, daß die Schmelztemperaturen sämtlicher RNA/DNA-Hybride in einem engen Fenster liegen. Durch Hybridisierung der gesamten RNA, bzw. der polyA⁺-RNA der zu untersuchenden Zellen an diesen Array unter Bedingungen maximaler Stringenz werden in jeder Kavität des Biochips RNA/DNA-Hybride erzeugt, falls die korrespondierende mRNA exprimiert wird. In einem 2. Schritt werden die immobilisierten Antisense-Anchor-DNAs an dem hybridisierten RNA-Template durch Behandlung mit einer RNaseH Reversen Transkriptase und modifizierten Nukleotiden, die vorzugsweise fluoreszenzmarkiert sind, verlängert. Nach mehreren Waschvorgängen, um nicht inkorporierte Nukleotide abzutrennen, können die cDNA-Reaktionsprodukte analog zu der beschriebenen LISPATM-Technik durch Laserabtastung der einzelnen Kavitäten gemessen werden.

20 Ausführungsbeispiele

1. Herstellung der Anchor- und Splinkeroligonukleotide

Die Anchor- und Splinker-Oligonukleotide wurden nach dem von Sinha N.D., Biernat J., McManus J., Köster H., *Nucleic Acids Res*, 1984 Jun, 12:11, 4539-57 beschriebenen Standardverfahren hergestellt oder durch eine Synthese in großem Maßstab, die nacheinander geviertelt wurde oder durch Simultansynthese auf Cellulosemembranen.

2. Markierung mit einer Modifikation

Modifikationen in den Oligonukleotiden wurden mit Standardverfahren durchgeführt.

30 3. Kopplung an die Matrix

Zu 10 µl Streptavidin-gekoppelten magnetisierten Beads (MERCK) in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1xTE/1 M NaCl, pH 7.5 wurden 20-200 pmol Biotin-markierte kinasierte Anchor-

Oligonukleotide zugesetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Anchor-Oligonukleotide durch einen dreimaligen Pufferwechsel von je 500 µl 1xTE, pH 7.5 gewaschen.

5 3. Erster Ligationsschritt

Die Ligation erfolgte bei 4°C, 16°C, Raumtemperatur bzw. 37°C (Standard 16°C) in einem Volumen von 50 µl in 1 x Ligasepuffer (Boehringer Mannheim) mit 1 bis 5 Einheiten T4 DNA Ligase (Boehringer Mannheim oder New England Biolabs) für 15 bis 60 Minuten. Für die Ligation wurden in der Regel 20 pmol phosphoryliertes Anchor-Oligonukleotid eingesetzt. Am
10 5'-Ende phosphorylierte Splinker-Oligonukleotide wurden in 1,5 bis 5fachem molaren Überschuß zugegeben. Nach der Reaktion wurden Ligase und nicht-ligierte Splinker-Oligonukleotide durch drei Pufferwechsel von je 500 µl 1xTE, pH 7.5 gewaschen. Danach wurde zu den gewaschenen Beads 40 µl eines Restriktionsmixes gegeben, der das Splinker-spezifische Restriktionsenzym Eco31I in 1,25x Restriktionspuffer (Puffer A von Boehringer
15 Mannheim bzw. Puffer 4 von New England Biolabs) enthielt. Danach wurde wie vorstehend beschrieben gewaschen.

5. Zweiter Ligationsschritt

Es wurden vier weitere Ligationen mit weiteren Splinker-Oligonukleotiden nach der unter Punkt
20 4 aufgeführten Vorschrift durchgeführt.

6. Transposition

Nach der 5. Ligation wurde nach dem Waschen ein Mix des Anchor-spezifischen Restriktionsenzyms Esp3I bzw. BpiI in den entsprechenden herstellerspezifischen Puffern
25 hinzugefügt und 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der komplette Mix mitsamt den abgeschnittenen aufligierten Splinker-Oligonukleotiden entfernt, in einem separaten Reaktionsgefäß 15 Minuten bei 65°C hitzebehandelt, um das Restriktionsenzym zu inaktivieren und sodann in ein weiteres Reaktionsgefäß mit entsprechend aufligierten, an magnetisierte Streptavidin-Beads gekoppelte Anchor-Oligonukleotide ligiert.

30

7. Restriktionskontrolle ligierter Fragmente

Zur Kontrolle der korrekten Größe der geschnittenen Splinker-Oligonukleotide wurde ein 5 µl

Aliquot der Reaktion auf einem 18%igen 1xTBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit 0,01% SYBR-Gold™ in 1 x TBE für 10 min angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Auf einem solchen Gel können Längenunterschiede von 1-2 Basen erkannt werden.

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte
 - a) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die
10 Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungs-
sequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner
Erkennungssequenz schneidet,
 - b) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit
einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches
15 außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt a), wobei dieses
Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann
 - d) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der
nicht zu ligierenden Enden fest gelegten Orientierung
 - e) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme
 - 20 e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym,
welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im
Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet,
 - f) Abtrennen des so verlängerten Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.
- 25 2. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend die Schritte
 - a) bis d) gemäß Anspruch 1,
 - e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem TypIIS Restriktionsenzym,
welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der
Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet,
 - 30 f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten Oligo-
nukleotid aus Schritt a),
 - g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f).

3. Verfahren nach Anspruch 2, ferner umfassend
 - h) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) stattfindet, und gegebenenfalls
 - 5 i) Spaltung des erhaltenen Nukleinsäuremoleküls mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt b) stattfindet.
4. Verfahren nach Anspruch 3, ferner umfassend Abtrennen des erhaltenen Nukleinsäure-
10 moleküls vom Reaktionsgemisch.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das in Schritt b) eingesetzte Oligonukleotid ein durch das Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 hergestelltes Nukleinsäuremolekül ist.
15
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei nach Schritt c) als Schritt c)' eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes c)' nach der
20 Reaktion entfernt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) an dem Ende, welches nicht an die Matrix gekoppelt ist, einen Teil einer Erkennungssequenz für ein TypII Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, und
25 der andere Teil der Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym vom Oligonukleotid aus Schritt b) stammt.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanatrest, eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist.
30
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) und/oder b) über einen Loop verfügt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a) über eine Modifikation im Loopbereich an die feste Matrix gekoppelt ist.
- 5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, ein Objektträger, ein DNA Chip, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die feste Matrix einen Streptavidin-
10 rest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder anti-Fluoresceinisothiocyanat-Antikörper umfasst.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Oligonukleotide aus Schritt a) und b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Einzelstrangüberhänge 1, 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind.
16. Verfahren nach Anspruch 1 bis 15, wobei die verschiedenen TypIIS
20 Restriktionsendonukleasen durch analog schneidende Ribozyme ersetzt werden
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei das Oligonukleotid in Schritt b) ein PCR-Produkt, ein Plasmidvektor, eine Phagen- oder Virus-DNA, ein künstliches Chromosom oder eine weitere synthetische DNA ist.
- 25 18. Kit zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend
- a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix
30 koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,

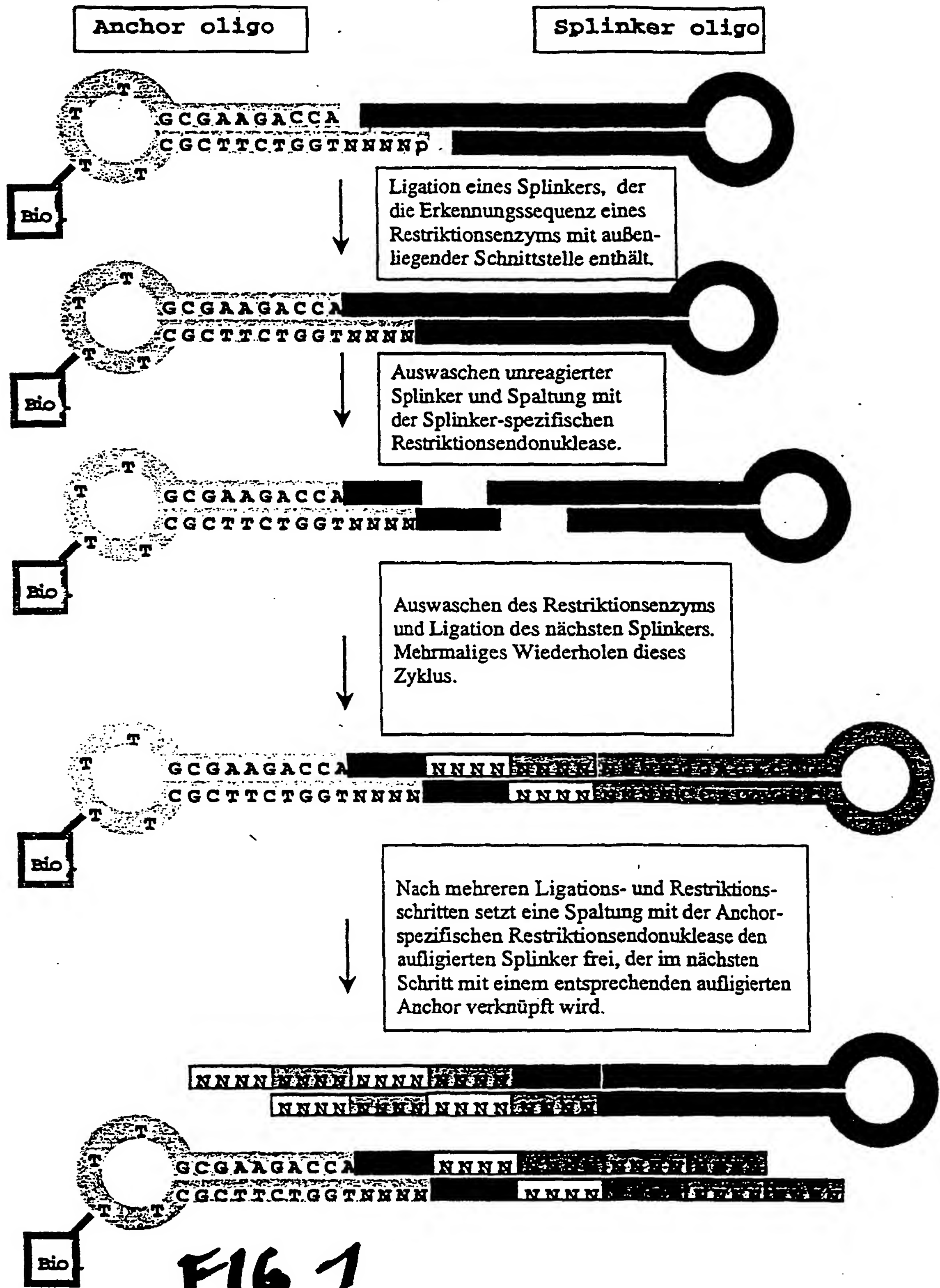
- 5 b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypII S Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem TypII S Restriktionsenzym aus a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym s aus Schritt a) enthält,
- c) eine feste Matrix,
- d) Reservoir e der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien.

10

19. Vorrichtung zur automatisierten Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch charakterisiert, dass sie

- 15 a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypII S Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- 20 b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypII S Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem TypII S Restriktionsenzym aus a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym s aus Schritt a) enthält,
- c) eine feste Matrix,
- 25 d) Reservoir e der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien, und
- e) ein Steuerungsprogramm, das einzelne Oligonukleotide aus a) und b) identifizieren, mit der festen Matrix aus c) und den benötigten Enzymen und/oder anderen Reagenzien aus d) zusammenbringen und die Abfolge von Herstellungsschritten
- 30 bestimmen und durchführen kann.

20. Verwendung des nach einem der vorstehenden Verfahren hergestellten Nukleinsäuremoleküls als DNA-Vakzine, zur Analyse von Proteindomänen, als Matrize für Designerproteine, zur schnellen Proteinsynthese, zur Herstellung von Ribozymen oder Aptameren, als Sonde zum Nachweis pathogener Mikroorganismen, als Sonde zum Nachweis der Expression von Genen, 5 zum Nachweis allelspezifischer Mutationen, zum Nachweis von Protein/Protein-Bindung, Protein/Peptid-Bindung und/oder der Bindung niedermolekularer Stoffe an Proteine.



2/8

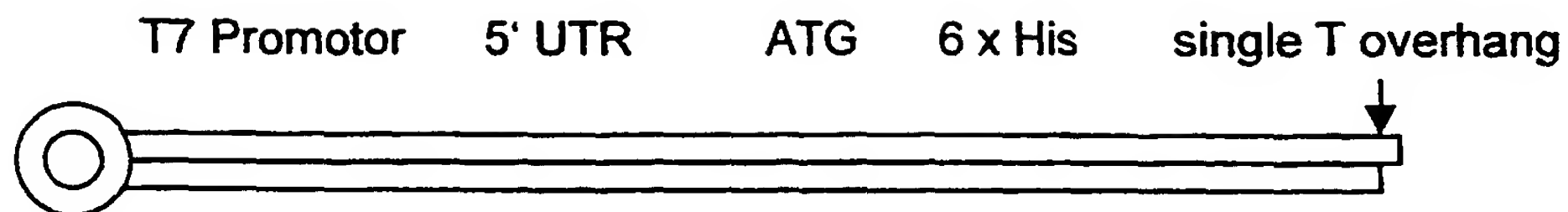


Fig. 2

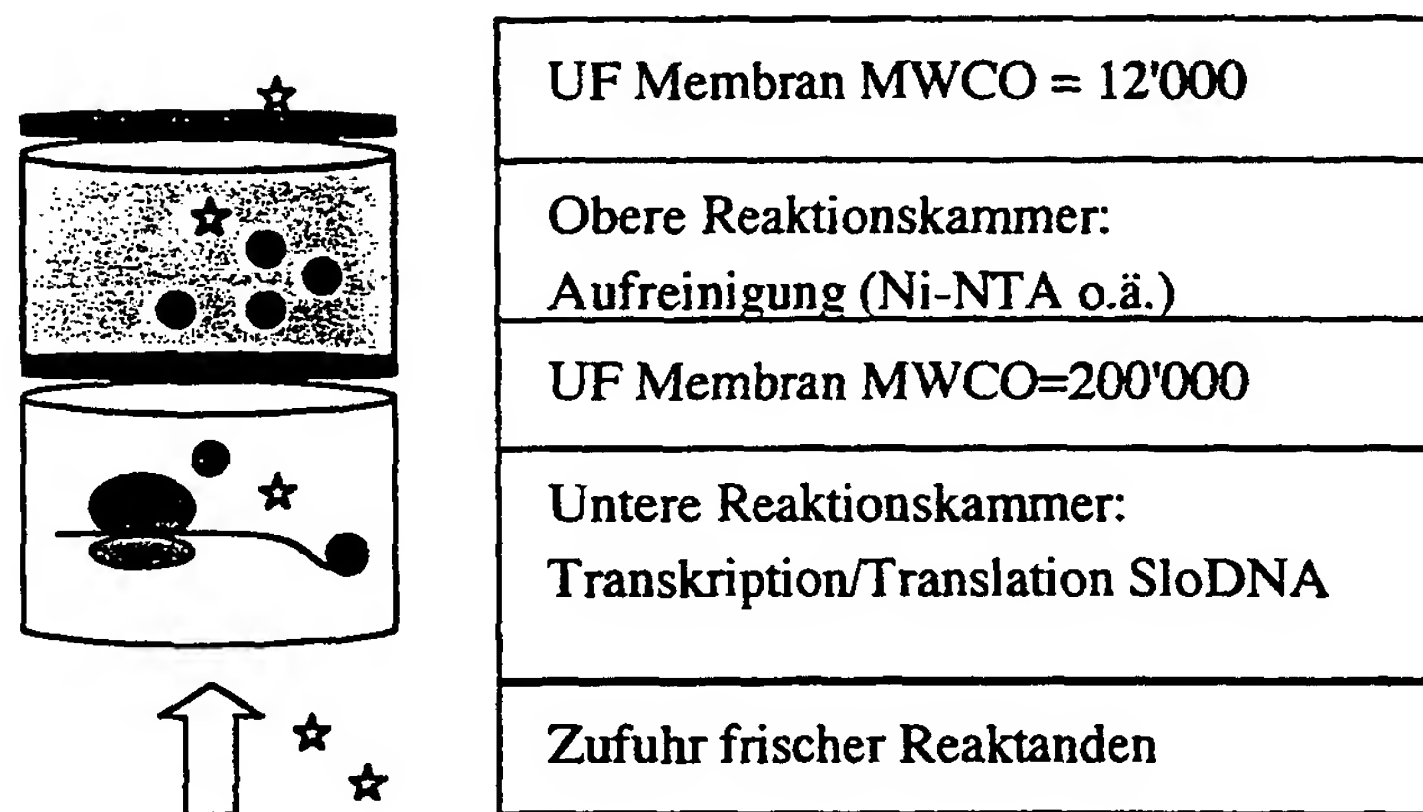
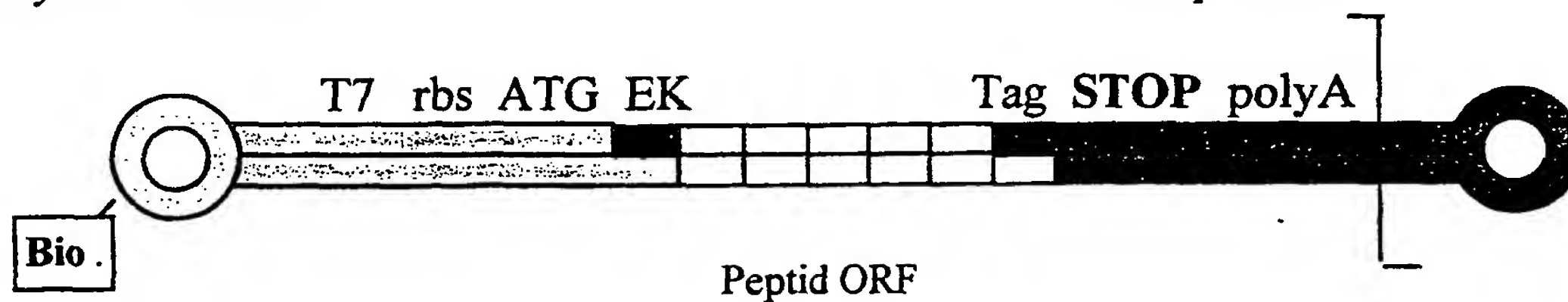


Fig. 3

*EasyPro™ Anchor**Endsplinker*Gekoppelte Transkription/
Translation

Peptid

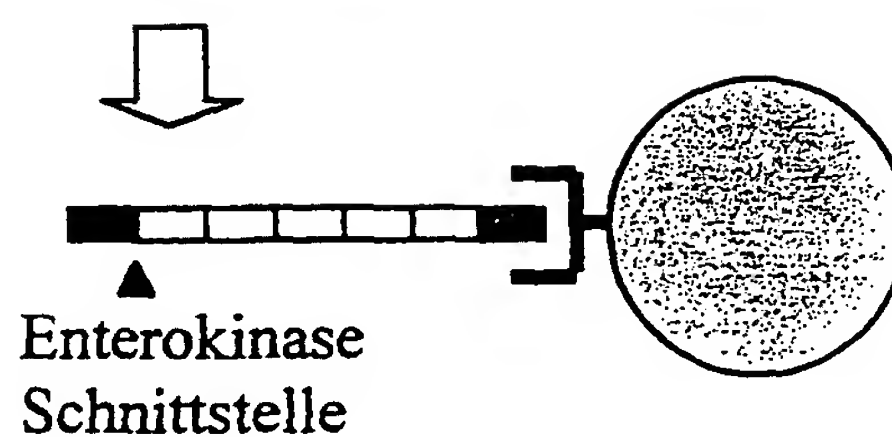


Fig. 4

3/8

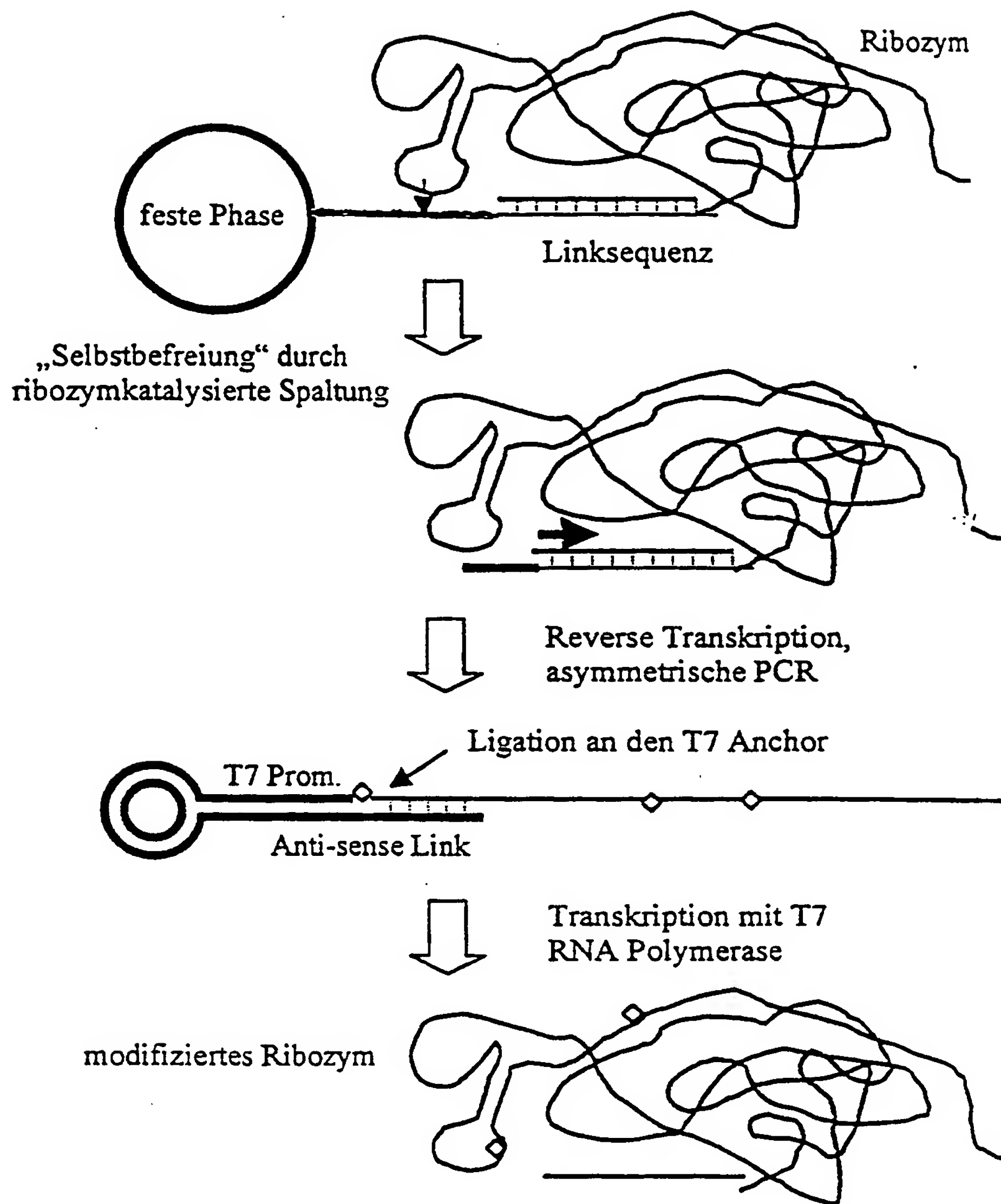


Fig. 5

4/8

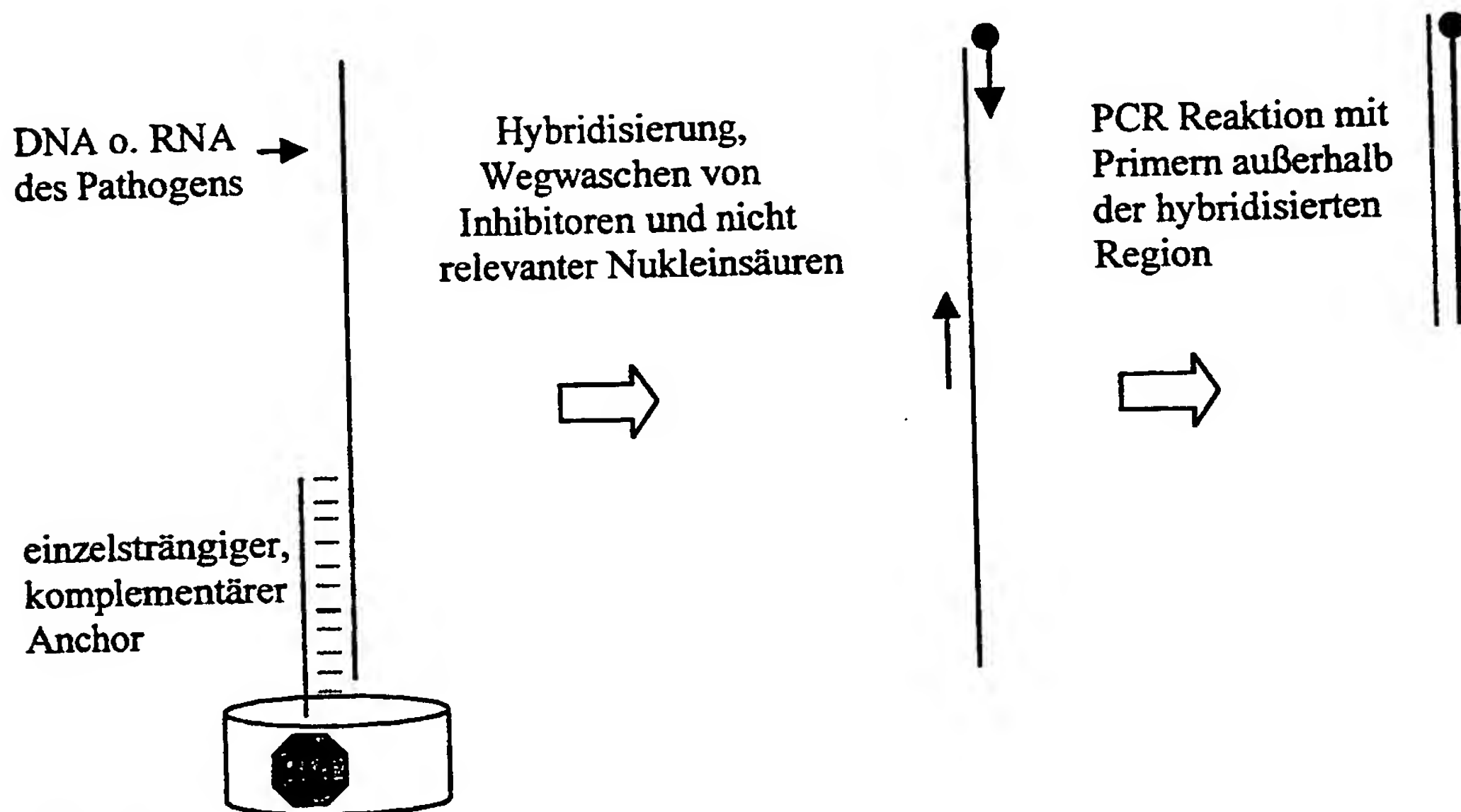


Fig. 6

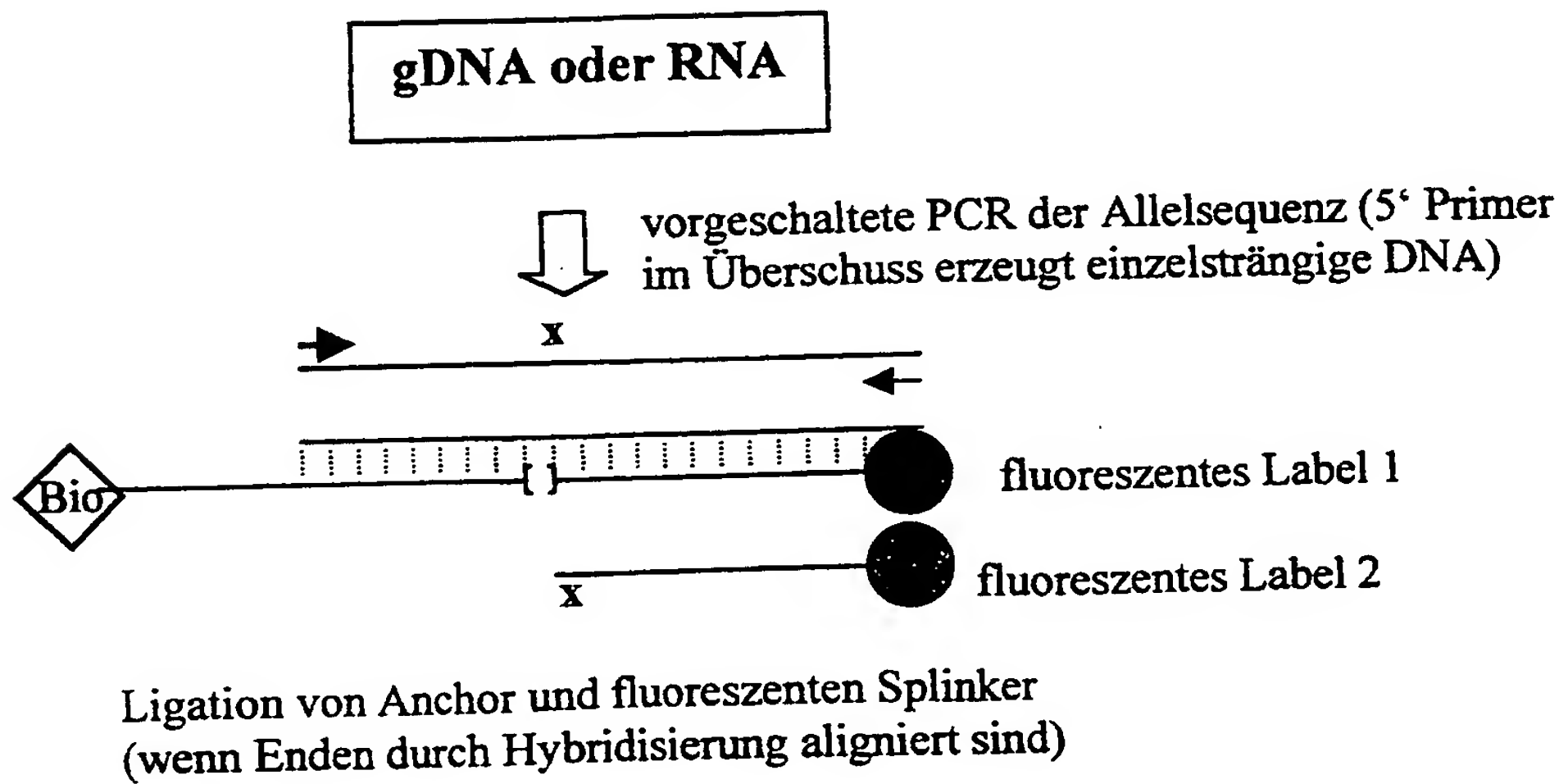


Fig. 7

5/8

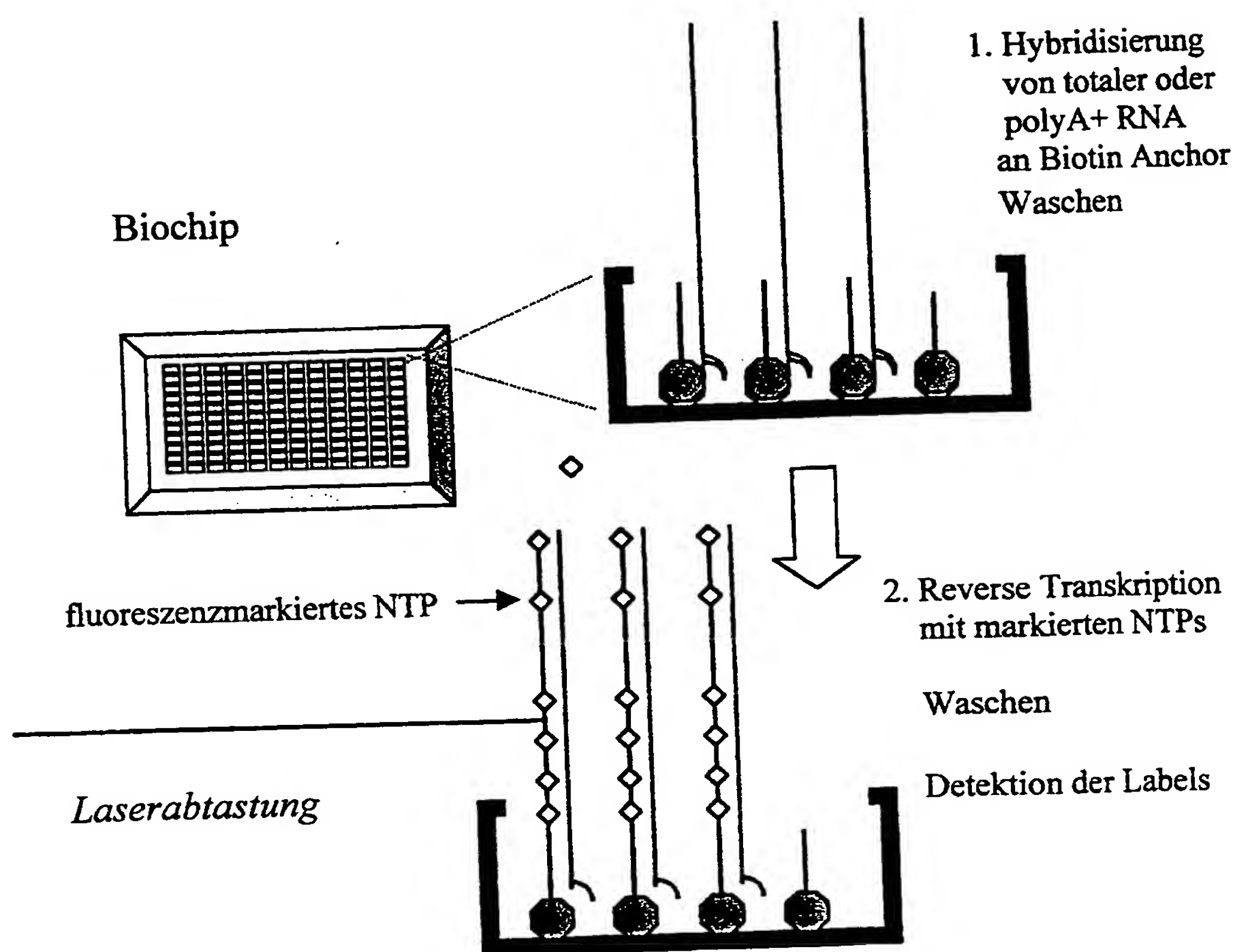


Fig. 8

6/8

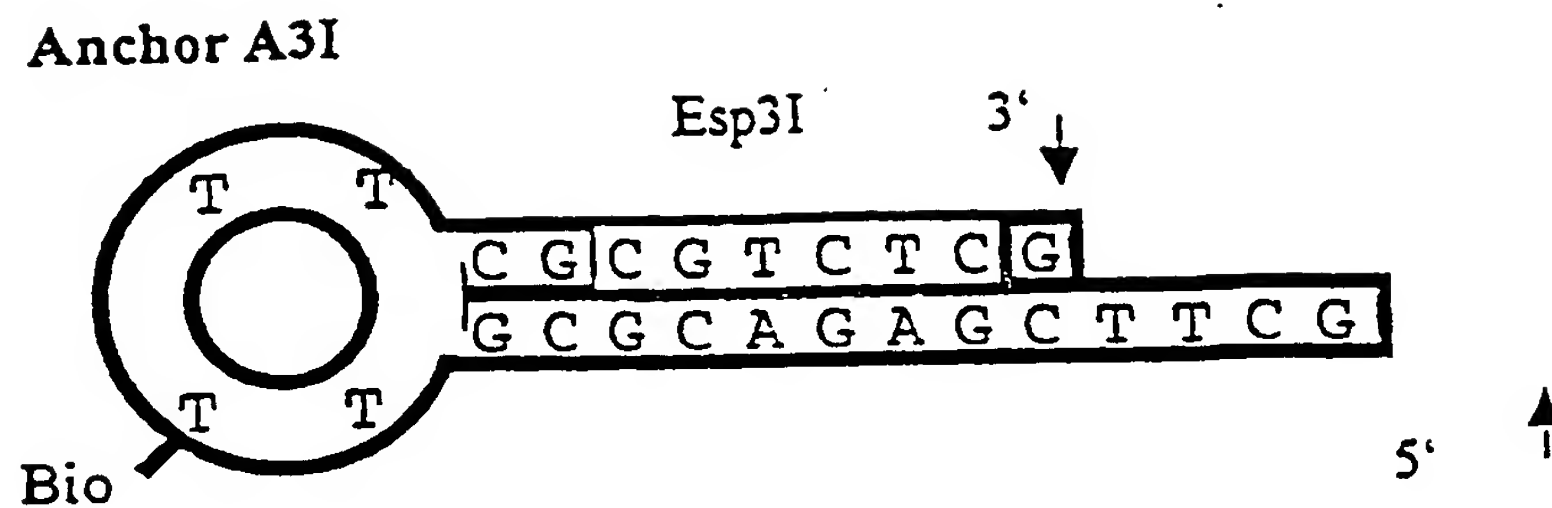


Fig. 9

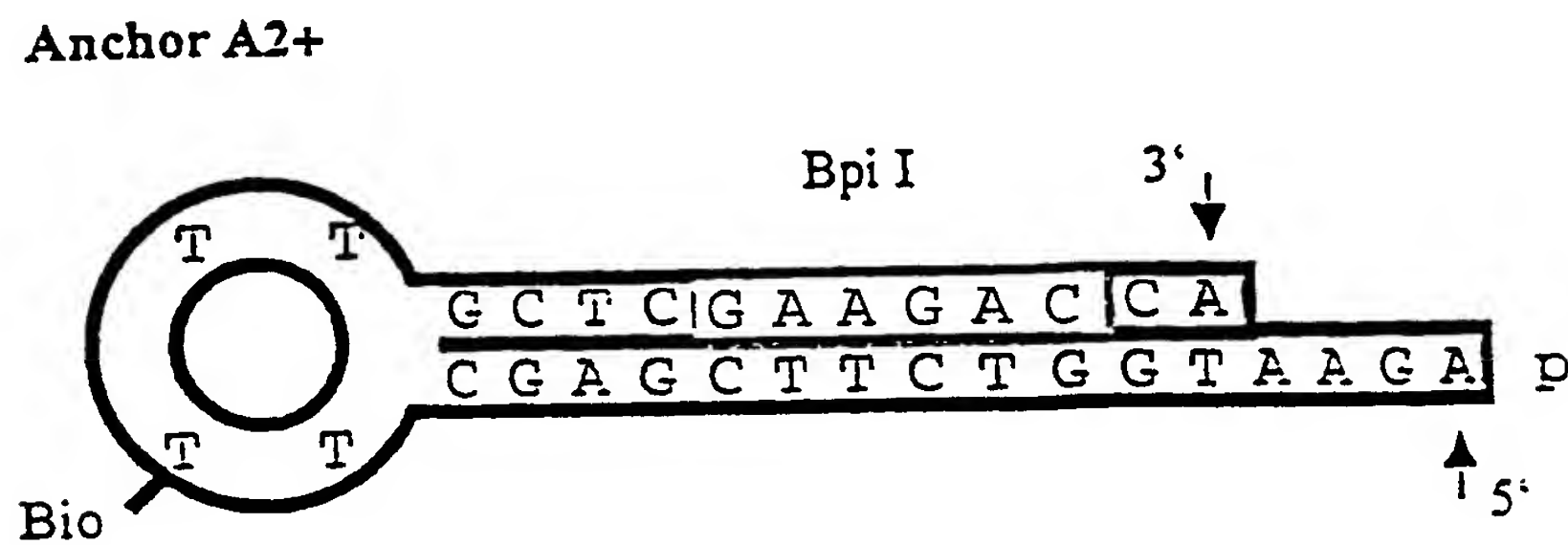


Fig. 10

Bipartite Anchor (Rekonstitution der Esp3I Schnittstelle erst nach Ligation)

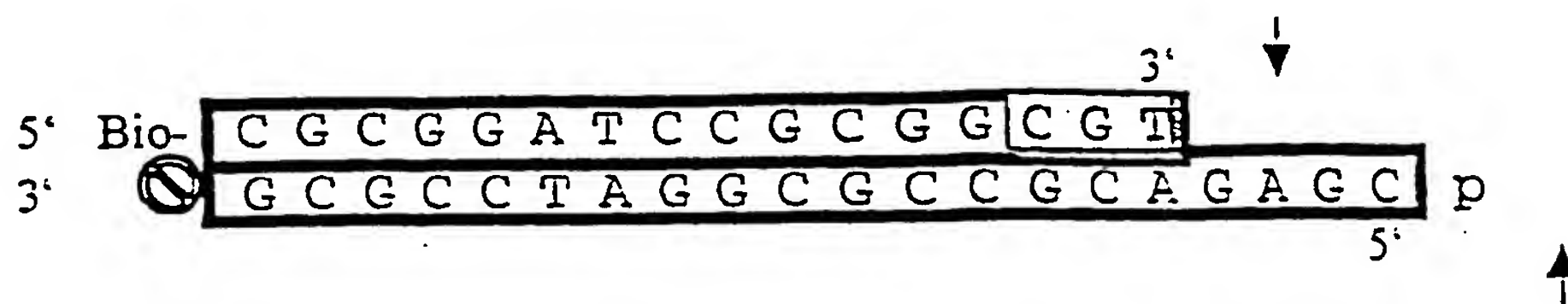


Fig. 11

7/8

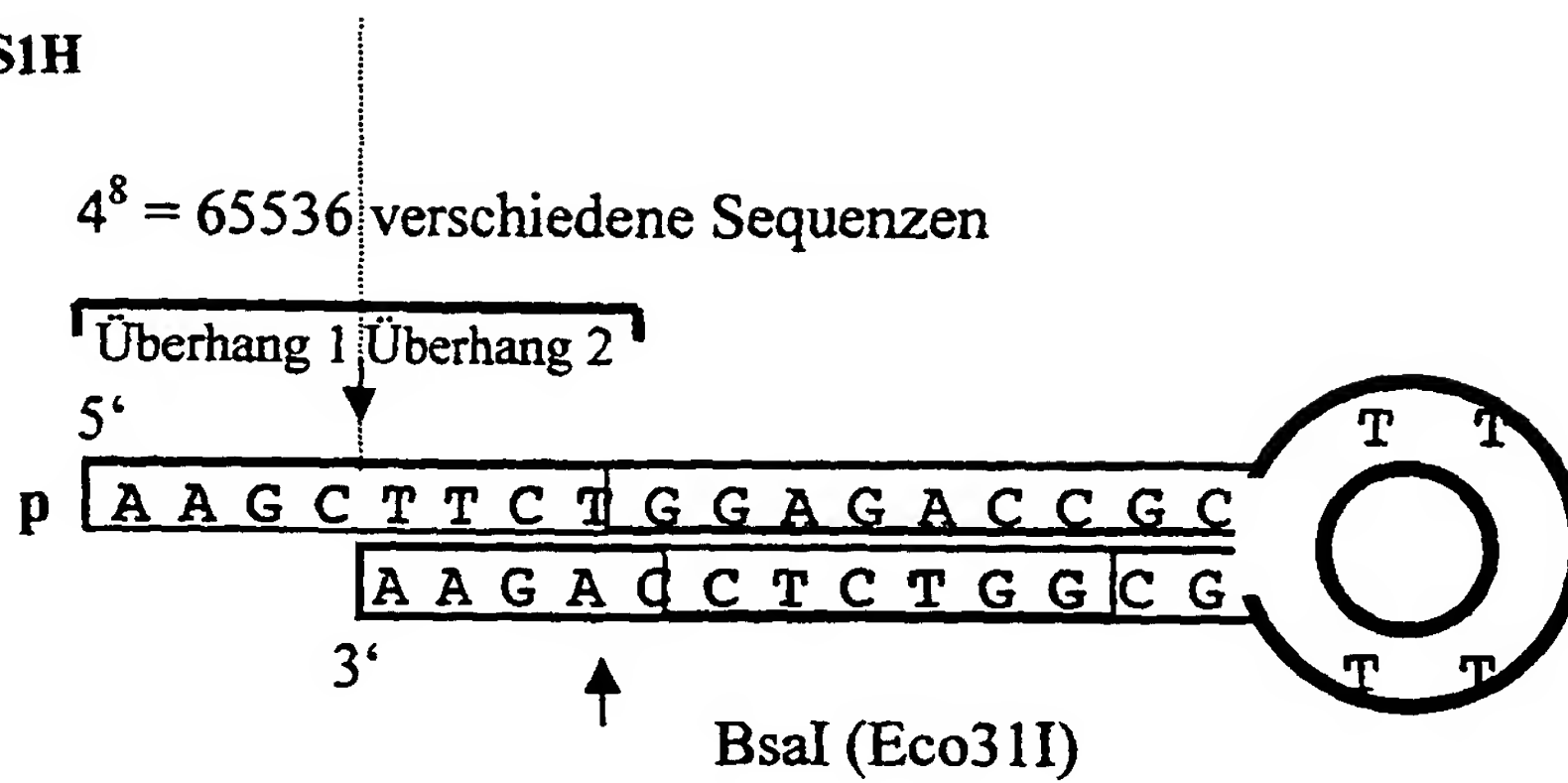
Splinker S1H

Fig. 12

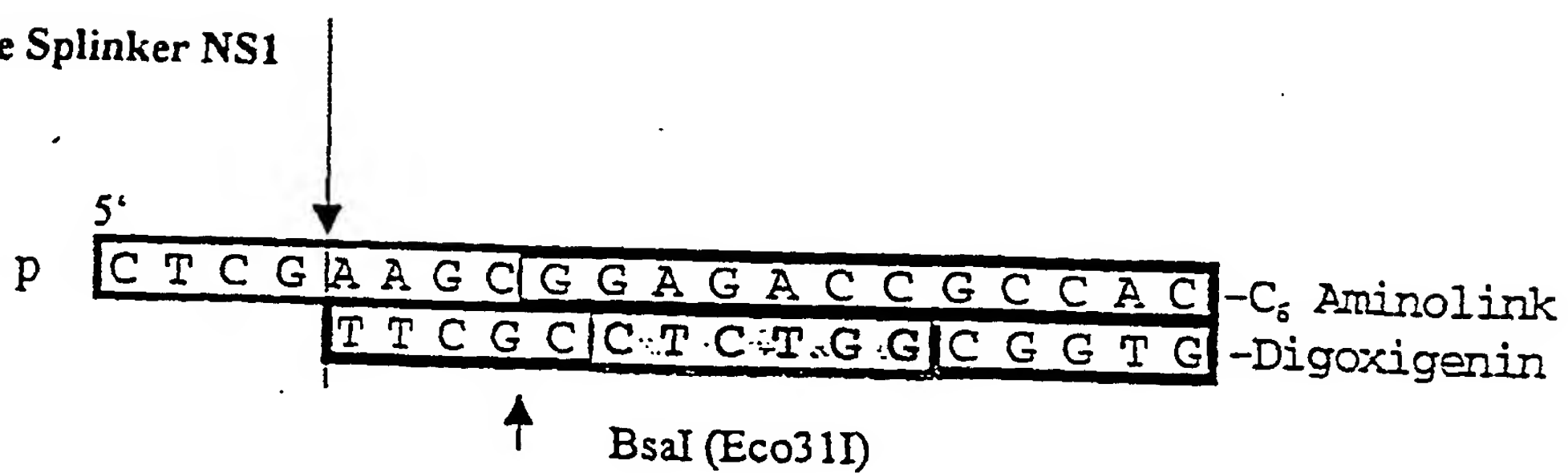
Bipartite Splinker NS1

Fig. 13

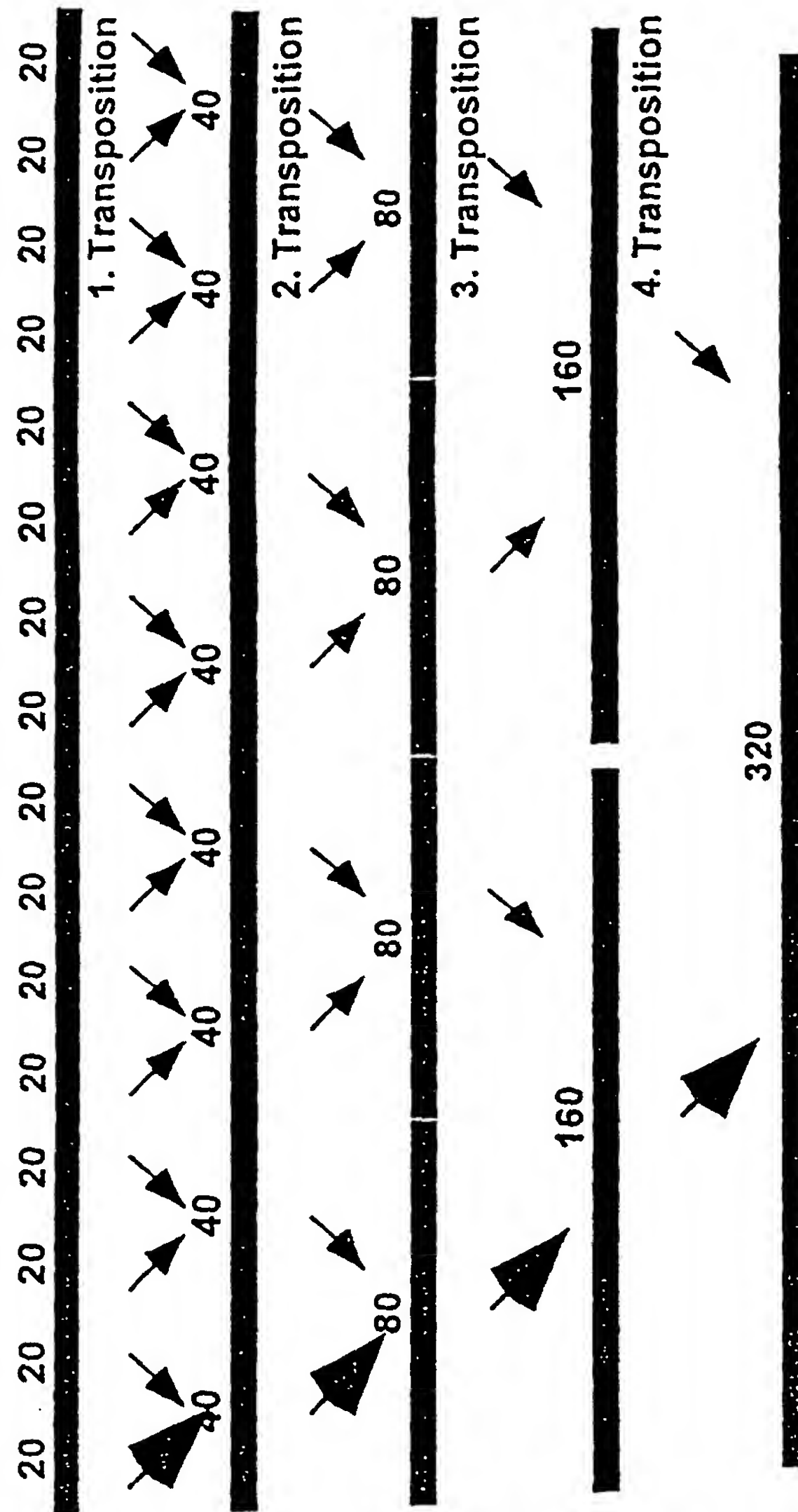


Fig. 14

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Diavir GmbH

5 <120> Verfahren zur Synthese von DNA-Fragmenten

<130> DV-001 PCT

<140> xx

10 <141> 2000-06-07

<150> DE 199 25 862.7

<151> 1999-06-07

15 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 1

30 gcttcgagac gcgttttcgc gtctcg

26

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

35 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

40

<400> 2

agaatggtct tcgagctttt gctcgaagac ca

32

45 <210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

50 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 3

55 cgcggatccg cggcgt

16

<210> 4

<211> 20

60 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

65 <223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 4
cgagacgccg cggatccgcg 20

5
<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

15 <400> 5 34
aagcttctgg agaccgcttt tgcggtctcc agaa

20 <210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

30 <400> 6 20
ctcgaagcgg agaccgccac

35 <210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonukleotid

45 <400> 7 16
gtggcggtct ccgctt

100

100

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75368 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/10, 15/11, C12P 19/34, C07H 21/00, C12Q 1/68

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DIAVIR GMBH [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01863

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHATZ, Octavian [DE/DE]; Steinbergstr. 30, D-85250 Altomünster (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): DE, JP, US.

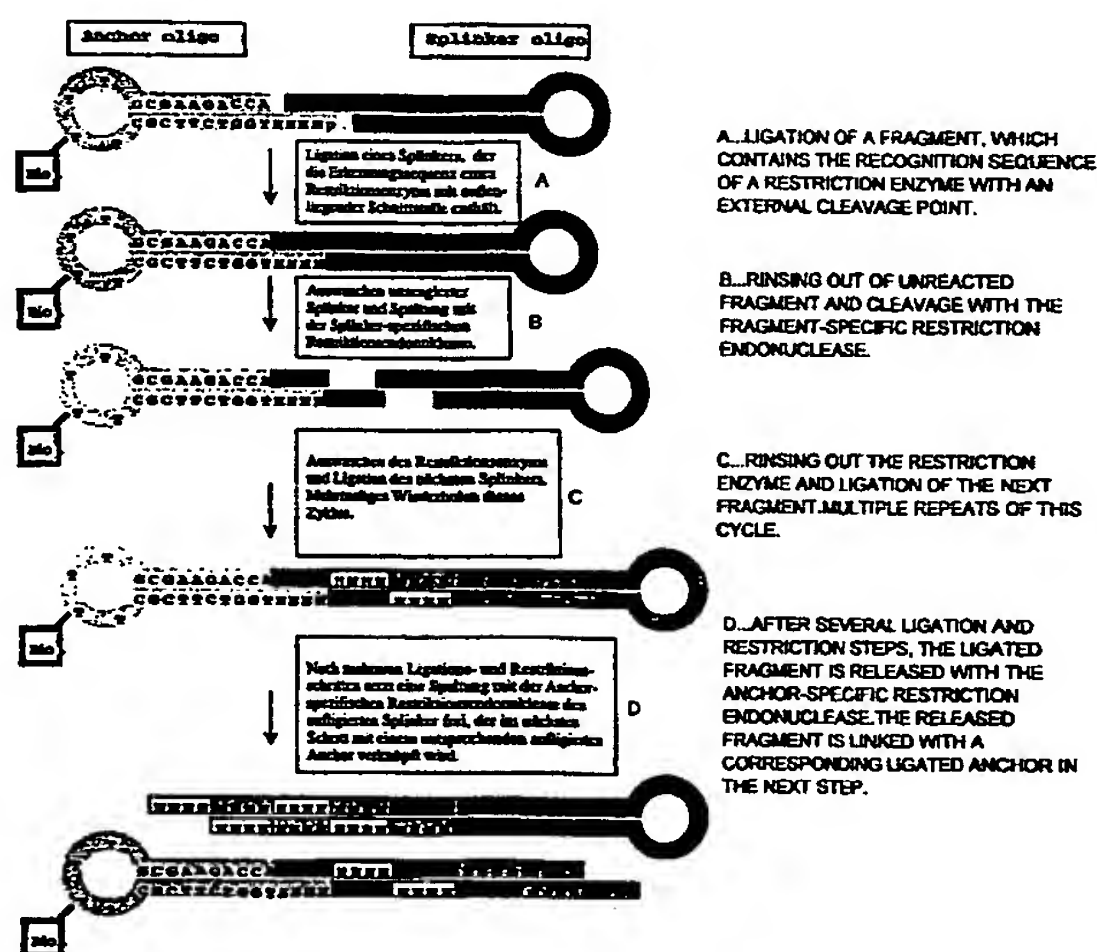
(30) Angaben zur Priorität:
199 25 862.7 7. Juni 1999 (07.06.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE SYNTHESIS OF DNA FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON DNA-FRAGMENTEN



(57) Abstract: The invention relates to a method that can be carried out in parallel and automated for the production of any nucleic acid, comprising the following steps: a) coupling an oligonucleotide to a solid matrix; b) adding an additional oligonucleotide; c) performing ligation of the oligonucleotide from steps a) and b) in an orientation; d) removing excess reactants and enzymes from the reaction preparation; e) effecting cleavage of the ligation product from step c) with a restriction system that cleaves outside the recognition sequence, whereby cleavage is effected in the shortened or lengthened oligonucleotide from step a) or in the oligonucleotide from step b); f) separating the reaction mixture from the lengthened or shortened oligonucleotide from step a); g) repeating at least one steps b) to f); h) performing successive sequence-independent linkage of the fragments obtained after executing steps a) to g) until the desired product is obtained.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein parallel ausführbares und automatisierbares Verfahren zur Herstellung einer beliebigen Nukleinsäure, umfassend die Schritte: a) Kopplung eines Oligonukleotids an eine feste Matrix; b) Zugabe eines weiteren Oligonukleotids; c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in einer Orientierung; d) Entfernung überschüssiger

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/75368 A3



Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

17. Mai 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Reaktanden und Enzyme aus dem Reaktionsansatz; e) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt c) mit einem ausserhalb der Erkennungssequenz spaltenden Restriktionsenzym, wobei die Spaltung entweder im Oligonukleotid aus Schritt a) oder im Oligonukleotid aus Schritt b) stattfindet; f) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt e) erhaltenen verlängerten oder verkürzten Oligonukleotid aus Schritt a); g) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte b) bis f); h) sukzessive sequenzunabhängige Verknüpfung der nach Durchführung der Schritte a) bis g) erhaltenen Fragmente bis zum Erhalt des gewünschten Produkts.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern 1al Application No
PCT/DE 00/01863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ; SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document	1-20
X	--- EUGEN UHLMANN: "An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" GENE, vol. 71, 15 November 1988 (1988-11-15), pages 29-40, XP000941756 the whole document	1-20
A	--- WO 93 19202 A (US ARMY) 30 September 1993 (1993-09-30) abstract; claims; figures 1,3 --- -/--	1-7,9, 12-15, 17-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2000

Date of mailing of the international search report

16/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pilat, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01863

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ; THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12 March 1998 (1998-03-12) claims; figures 6A-C, 7A-C ---	1-4, 9, 12-15, 18-20
A	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, vol. 94, 28 September 1990 (1990-09-28), pages 103-107, XP000941757 the whole document ---	
P, X	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23 September 1999 (1999-09-23) abstract; claims 1-24 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01863

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517413 A	29-06-1995	DE 4343591 A	22-06-1995
WO 9319202 A	30-09-1993	AU 3798393 A	21-10-1993
		EP 0631636 A	04-01-1995
		JP 7507201 T	10-08-1995
		US 5503995 A	02-04-1996
WO 9810095 A	12-03-1998	AU 721861 B	13-07-2000
		AU 4027497 A	26-03-1998
		CN 1234076 A	03-11-1999
		EP 0927267 A	07-07-1999
WO 9947536 A	23-09-1999	DE 19812103 A	23-09-1999
		AU 3699899 A	11-10-1999
		EP 1047706 A	02-11-2000

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01863

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34 C07H21/00 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ; SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29) das ganze Dokument	1-20
X	EUGEN UHLMANN: "An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" GENE, Bd. 71, 15. November 1988 (1988-11-15), Seiten 29-40, XP000941756 das ganze Dokument	1-20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pilat, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 19202 A (US ARMY) 30. September 1993 (1993-09-30) Zusammenfassung; Ansprüche; Abbildungen 1,3 ---	1-7,9, 12-15, 17-19
A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ; THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche; Abbildungen 6A-C,7A-C ---	1-4,9, 12-15, 18-20
A	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757 das ganze Dokument ---	
P,X	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23) Zusammenfassung; Ansprüche 1-24 -----	1-20

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichen
PCT/DE 00/01863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9517413 A	29-06-1995	DE 4343591 A	22-06-1995
WO 9319202 A	30-09-1993	AU 3798393 A	21-10-1993
		EP 0631636 A	04-01-1995
		JP 7507201 T	10-08-1995
		US 5503995 A	02-04-1996
WO 9810095 A	12-03-1998	AU 721861 B	13-07-2000
		AU 4027497 A	26-03-1998
		CN 1234076 A	03-11-1999
		EP 0927267 A	07-07-1999
WO 9947536 A	23-09-1999	DE 19812103 A	23-09-1999
		AU 3699899 A	11-10-1999
		EP 1047706 A	02-11-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/DE 00/01863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ; SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document	1-20
X	EUGEN UHLMANN: "An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" GENE, vol. 71, 15 November 1988 (1988-11-15), pages 29-40, XP000941756 the whole document	1-20
A	WO 93 19202 A (US ARMY) 30 September 1993 (1993-09-30) abstract; claims; figures 1,3	1-7, 9, 12-15, 17-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2000

Date of mailing of the international search report

16/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pilat, D

INTERNATIONAL RCH REPORT

Intern	Patent Application No
PCT/DE 00/01863	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12 March 1998 (1998-03-12) claims; figures 6A-C,7A-C ---	1-4,9, 12-15, 18-20
A	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, vol. 94, 28 September 1990 (1990-09-28), pages 103-107, XP000941757 the whole document ---	
P,X	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23 September 1999 (1999-09-23) abstract; claims 1-24 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01863

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517413 A	29-06-1995	DE 4343591 A	22-06-1995
WO 9319202 A	30-09-1993	AU 3798393 A	21-10-1993
		EP 0631636 A	04-01-1995
		JP 7507201 T	10-08-1995
		US 5503995 A	02-04-1996
WO 9810095 A	12-03-1998	AU 721861 B	13-07-2000
		AU 4027497 A	26-03-1998
		CN 1234076 A	03-11-1999
		EP 0927267 A	07-07-1999
WO 9947536 A	23-09-1999	DE 19812103 A	23-09-1999
		AU 3699899 A	11-10-1999
		EP 1047706 A	02-11-2000

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01863

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/10 C12N15/11 C12P19/34 C07H21/00 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C12P C07H		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ; SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29) das ganze Dokument	1-20
X	EUGEN UHLMANN: "An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA" GENE, Bd. 71, 15. November 1988 (1988-11-15), Seiten 29-40, XP000941756 das ganze Dokument	1-20
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
21. Dezember 2000		16/01/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Pilat, D

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01863

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 19202 A (US ARMY) 30. September 1993 (1993-09-30) Zusammenfassung; Ansprüche; Abbildungen 1,3 ---	1-7,9, 12-15, 17-19
A	WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche; Abbildungen 6A-C,7A-C ---	1-4,9, 12-15, 18-20
A	WLODEK MANDECKI ET AL.: "A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli" GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757 das ganze Dokument ---	
P,X	WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23) Zusammenfassung; Ansprüche 1-24 -----	1-20

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichen

PCT/DE 00/01863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9517413	A	29-06-1995	DE	4343591 A	22-06-1995
WO 9319202	A	30-09-1993	AU	3798393 A	21-10-1993
			EP	0631636 A	04-01-1995
			JP	7507201 T	10-08-1995
			US	5503995 A	02-04-1996
WO 9810095	A	12-03-1998	AU	721861 B	13-07-2000
			AU	4027497 A	26-03-1998
			CN	1234076 A	03-11-1999
			EP	0927267 A	07-07-1999
WO 9947536	A	23-09-1999	DE	19812103 A	23-09-1999
			AU	3699899 A	11-10-1999
			EP	1047706 A	02-11-2000

101009926
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference S 10002 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/01863	International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant SLONING BIOTECHNOLOGY GMBH		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 January 2001 (08.01.01)	Date of completion of this report 26 September 2001 (26.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01863

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-30, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 17-20, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1-16, filed with the letter of 13 September 2001 (13.09.2001)
- ☒ the drawings:
 pages 1/8-8/8, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01863

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

SEE SEPARATE SHEET

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01863

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

See the Supplemental Box.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

Box I**Basis of the report**

1. This report makes reference to the following documents:

D1: WO-A-95/17413 (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH;
SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER)
29 July 1995 (1995-06-29)

D2: EUGEN UHLMANN: 'An alternative approach in gene
synthesis: use of long selfpriming
oligodeoxynucleotides for the construction of
double-stranded DNA', GENE, Vol. 71, 15 November
1988 (1988-11-15), pages 29 - 40, XP000941756

D3: WO-A-93/19202 (US ARMY) 30 September 1993
(1993-09-30)

D4: WO-A-98/10095 (BRAX GENOMICS LTD; THOMPSON ANDREW
HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12 March 1998
(1998-03-12)

D5: WLODEK MANDECKI ET AL.: 'A totally synthetic
plasmid for general cloning, gene expression and
mutagenesis in Escherichia coli', GENE, Vol. 94,
28 September 1990 (1990-09-28), pages 103 - 107,
XP000941757

D6: WO-A-99/47536 (BERNAUER ANNETTE)
23 September 1999 (1999-09-23)

D7: WO-A-99/47536

2) Amendments (PCT Article 34(2)(b))

- 2.1 The amendments submitted with the letter of 13.9.01
appear to be allowable. They do not appear to go

.../...

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

beyond the disclosure in the international application as filed and therefore satisfy PCT Article 34(2)(b).

The basis for the amended Claim 1 is the paragraph bridging pages 7 and 8, page 12, lines 18 - 21 and page 13, lines 10 - 18, as well as Figures 1 and 14.

Box II**Priority**

- 3.1 The method according to Claim 1 appears to enjoy priority.
- 3.2 The claimed embodiment which relates to an oligonucleotide of step a) that contains part of recognition sequence for a type IIS restriction enzyme as claimed in Claims 5, 15 and 16 is not to be found in the priority document.

These extensions are therefore not directly or inevitably derivable from the priority document. Consequently, the P document is considered to be prior art for Claims 5, 15 and 16 and their dependent claims.

.../...

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

Box V**Reasoned statement under PCT Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

4.1 The method in Claim 1 appears to be novel over D1.

D1 does not describe either all the claimed steps or their sequence. Nor does D1 teach that the oligonucleotides produced are used in the parallel method or that two type IIS restriction enzymes must be used in order to force a sequence-independent, orientation-specific ligation.

4.2 D2 describes the use of an oligonucleotide which is self-complementary at the 3' end. Those oligonucleotides are filled up to form a double strand by a polymerase activity. The open end is digested by a restriction enzyme and ligated to an end of a vector which has been cut in a matching complementary fashion. The 3' self-complementary end of the ligated oligonucleotide can be digested by a restriction enzyme and ligated to a further oligonucleotide or can be the complementary end of a recirculating plasmid.

D2 does not describe either all the claimed steps or their sequence. Nor does D2 teach that the oligonucleotides are synthesised in a restriction/ligation cycle or that the oligonucleotides so produced are used in the parallel method.

.../...

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

4.3 Since Claim 1 enjoys the priority date of the priority document, D6 is not regarded as prior art.

4.4 None of the documents D3 to D5 discloses a method according to Claims 1 - 14. Similarly, D6 does not disclose a method according to Claim 5.

None of the documents D3 to D6 discloses a kit or a device that uses such a kit according to Claims 15 and 16. Consequently, these claims appear to be novel over the available prior art.

4) Inventive step (PCT Article 33(3))

Document D1, which is regarded as the closest prior art, discloses a method for producing oligomeric or polymeric functional elements which are generated according to a given plan by linkage of at least two design elements using a solid phase as a reaction support. The design elements are linked in a predetermined sequence and micro-reaction first steps can be carried out in parallel.

In the stepwise linkage of design elements, each design element is preferably coupled as a reaction partner to a solid phase. If nucleic acids are used, it is advantageous to provide at least one reaction partner with a Class IIS endonuclease identification interface which allows specific linkage of any desired sequences.

.../...

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

The Class IIS endonuclease identification interface incorporated in the single-strand end to be cut off makes it possible reform a double-stranded nucleic acid element which is bound to the solid phase. The subject matter of Claim 1 differs in that the oligonucleotides produced by an enzymatic ligation/restriction cycle are themselves bound.

The problem to be solved by the present invention was therefore to provide a method which allows fast and efficient synthesis of a nucleotide with the fewest possible ligation steps.

None of the documents D1 to D5, either alone or in any combination, proposes a method wherein a sequential synthesis is combined with a parallel synthesis.

The solution to this problem proposed in Claims 1 - 14 of the present application therefore appears to involve an inventive step.

Document D1 is regarded as the closest prior art for Claim 15. D1 describes the use of parallel-structured design libraries of functional oligomers or polymers (cf. page 8, second paragraph).

The difference between D1 and the claimed kit is that the two different libraries contain oligonucleotides which have recognition sequences for the restriction enzyme that are different from type IIS;

.../...

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I, II, V

one library contains oligonucleotides which have a modification at one end and which can therefore be coupled to a solid matrix.

Since the non-obvious method described above requires the specific design of the kit, there is no suggestion in documents D1 to D5 to assemble such a kit. The solution to this problem proposed in Claim 15 of the present application therefore appears to involve an inventive step.

The device of Claim 16 appears to be inventive, provided that it is characterized by its essential technical features and is so linked with the invention as to form a single general inventive concept. The device cannot be characterized by the components it uses (e.g., a glass cannot be characterized by its contents).

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REI 28 SEP 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts DV-001 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01863	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 07/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder Sloning BioTechnology GmbH, et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 08/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.09.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Pilat, D Tel. Nr. +49 89 2399 8668



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

17-20 ursprüngliche Fassung

1-16 mit Telefax vom 13/09/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01863

siehe Beiblatt



Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

1) Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ;SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29)
- D2: EUGEN UHLMANN: 'An alternative approach in gene synthesis: use of long selfpriming oligodeoxynucleotides for the construction of double-stranded DNA' GENE, Bd. 71, 15. November 1988 (1988-11-15), Seiten 29-40, XP000941756
- D3: WO 93 19202 A (US ARMY) 30. September 1993 (1993-09-30)
- D4: WO 98 10095 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 12. März 1998 (1998-03-12)
- D5: WLODEK MANDECKI ET AL.: 'A totally synthetic plasmid for general cloning, gene expression and mutagenesis in Escherichia coli' GENE, Bd. 94, 28. September 1990 (1990-09-28), Seiten 103-107, XP000941757
- D6: WO 99 47536 A (BERNAUER ANNETTE) 23. September 1999 (1999-09-23)
- D7: WO-A-9947536

2) Änderungen (Artikel 34 (2) (b) PCT

2.1 Die mit Schreiben vom 13.9.01 eingereichten Änderungen scheinen zulässig zu sein. Diese scheinen nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung hinaus zu gehen und genügen deshalb dem Artikel 34 (2) b) PCT.

Basis für den geänderten Anspruch 1 wird in der Anmeldung auf S. 7-8 übergreifender §, S.12 Z.18-21 und S.13 Z.10-18 sowie durch die Abbildungen 1 & 14 gestützt.

Zu Punkt II

Priorität

3.1 Das Verfahren laut Anspruch 1 scheint die Priorität zu genießen.

3.2 Die beanspruchte Ausführungsart die sich auf ein Oligonukleotid aus Schritt a),

welches einen Teil einer Erkennungssequenz für ein TypIIIS Restriktionsenzym enthält, wie in den Ansprüchen 5, 15, 16 beansprucht, ist im Prioritätsdokument nicht vorhanden.

Diese Erweiterungen sind deshalb nicht direkt oder unweigerlich vom Prioritätsdokument zu entnehmen. Infolgedessen ist das P Dokument als Stand der Technik zu betrachten für die Ansprüche 5, 15, 16 und deren abhängigen Ansprüche.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

4) Neuheit (Artikel 33 (2) PCT)

4.1 Das Verfahren im Anspruch 1 scheint gegenüber D1 neu zu sein.

D1 beschreibt weder all die beanspruchten Schritte, noch ihre Abfolge. D1 lehrt auch weder die hergestellten Oligonukleotide im Parallelverfahren zu benutzen, noch daß zwei Typ IIS Restriktionsenzyme eingesetzt werden müssen, um eine Sequenzunabhängige und Orientierungsspezifische Ligation zu erzwingen.

4.2 D2 beschreibt die Benutzung eines Oligonukleotid das am 3' Ende selbstkomplementär ist. Diese Oligonukleotide werden durch eine Polymerase Aktivität zu einem Doppelstrang aufgefüllt. Das offene Ende wird durch ein Restriktionsenzym abverdaut und an einem passend komplementär geschnittenen Ende eines Vektors anligiert. Das 3' selbstkomplementäre Ende des anligierten Oligonukleotids kann durch ein Restriktionsenzym abverdaut werden und mit einem weiteren Oligonukleotid anligiert werden oder das komplementäres Ende eines rezirkulierenden Plasmids sein.

D2 beschreibt weder all die beanspruchten Schritte, noch ihre Abfolge. D2 lehrt auch nicht die Oligonukleotide in einem Restriktions/Ligations Zyklus zu synthetisieren noch die so hergestellten Oligonukleotiden im Parallelverfahren zu benutzen.

4.3 Indem Anspruch 1 das Prioritätsdatum des Prioritätsdokument genießt, ist D6

nicht als Stand der Technik anzusehen.

- 4.4 Keines der Dokumente D3 bis D5 offenbart ein Verfahren gemäß Ansprüche 1-14. Gleichmaßen offenbart auch D6 kein Verfahren gemäß Anspruch 5. Keines der Dokumente D3 bis D6 offenbart ein Kit und eine Vorrichtung die solch einen Kit benutzt gemäß Anspruch 15 und 16. Es scheint deshalb daß diese Ansprüche gegenüber dem vorliegenden Stand der Technik neu sind.

4) Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33 (3) PCT)

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Herstellung oligomerer oder polymerer Funktionselemente, die durch Verknüpfung von mindestens zwei Formenelementen unter Einsatz einer festen Phase als Reaktionsträger, planmäßig generiert werden. Die Formenelemente werden in vorbestimmter Reihenfolge verknüpft und können in parallel geführten Mikro-Reaktionsansätzen durchgeführt werden.

Vorzugsweise wird bei der schrittweisen Verknüpfung der Formenelemente, jeweils ein Formenelement als Reaktionspartner an eine feste Phase gekoppelt. Werden Nukleinsäuren verwendet, so ist es vorteilhaft wenigstens ein Reaktionspartner mit einer Endonukleaseerkennungsschnittstelle der Klasse IIS zu versehen, sodass sie eine gerichtete Verknüpfung von beliebigen Sequenzen erlauben.

Die in dem abzuschneidenden einzelsträngigen Ende eingebaute Endonukleaseerkennungsschnittstelle der Klasse IIS ermöglicht die Herstellung eines wieder doppelsträngigen, an der festen Phase gebundenen Nukleinsäureelements. Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich dadurch, daß die durch einen enzymatischen Ligations/Restriktions Zyklus hergestellten Oligonukleotide wiederum ihrerseits verbunden werden.

Die vorliegende Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen welches eine schnelle und effiziente Synthese einer Nukleinsäure bei einer möglichst geringen Anzahl von Ligationsschritten erlaubt.

Keines der Dokumente D1 bis D5 schlägt, weder alleine noch in irgendeiner Kombination, ein Verfahren vor, das eine sequentielle Synthese mit einer parallelen Synthese kombiniert werden soll.





Die in Anspruch 1-14 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung scheint deshalb auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen gegenüber Anspruch 15. D1 beschreibt die Verwendung parallel aufgebauter Formen-Bibliotheken funktionaler Oligomere oder Polymere (vgl. S.8, 2§).

Der Unterschied zwischen D1 und dem beanspruchten Kit liegt darin daß die zwei verschiedenen Bibliotheken Oligonukleotiden enthalten, die hinsichtlich der Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme vom Typ IIS verschieden sind, wobei eine Bibliothek Oligonukleotiden enthält, die über eine Modifikation an einem Ende verfügen und somit an einer festen Matrix koppelbar sind.

Nachdem das oben nicht naheliegende beschriebene Verfahren die spezifische Ausgestaltung des Kits bedingt, gibt es kein Hinweis in den Dokumente D1 bis D5 solch ein Kit zusammenzusetzen. Die in Anspruch 15 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung scheint deshalb auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen.

Die Vorrichtung des Anspruch 16, scheint erfinderisch zu sein, unter Vorbehalt das diese Vorrichtung durch ihre essentiellen technischen Merkmale charakterisiert wird und mit der Erfindung eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklicht. Die Vorrichtung kann nicht durch ihre benutzten Bestandteile charakterisiert werden (z.B. ein Glas durch sein Inhalt).



Sloning BioTechnology GmbH
PCT/DE00/01863 / S 10002 PCT

Neue Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls umfassend die Schritte

- a) Bereitstellen eines Oligonukleotids, das hergestellt ist durch die folgenden Schritte:
 - aa) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
 - ab) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt aa), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
 - ac) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt aa) und ab) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden festgelegten Orientierung,
 - ad) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
 - ae) Spaltung des Ligationsprodukts aus Schritt ac) mit einem TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung in der Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotids aus Schritt ab) stattfindet,
 - af) Abtrennen des Reaktionsgemisches vom in Schritt ae) erhaltenen verlängerten Oligonukleotid aus Schritt aa),
 - ag) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte ab) bis af),
- b) Bereitstellen eines weiteren Oligonukleotids, das hergestellt ist durch die Schritte:

GEÄNDERTES BLATT



- ba) Kopplung eines Oligonukleotids mit einem Ende an eine feste Matrix, wobei die Kopplung über eine Modifikation erfolgt, und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz für ein TypII Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- bb) Zugabe eines weiteren, mindestens teilweise doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer anderen Erkennungssequenz für ein TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, als in Schritt ba), wobei dieses Oligonukleotid nicht an die Matrix binden kann,
- bc) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt ba) und bb) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden festgelegten Orientierung,
- bd) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,
- be) Spaltung des Ligationsproduktes aus Schritt bc) mit einem TypII Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid in Schritt bb) stattfindet,
- bf) Abtrennen des so verlängerten Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch,
- bg) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte bb) bis bf), wobei im Anschluss an die letzte Ligation in Schritt bc) und Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme das Ligationsprodukt mit einem TypII Restriktionsenzym geschnitten wird, wobei die Spaltung im Oligonukleotid in Schritt ba) stattfindet,
- c) Ligation der Oligonukleotide aus Schritt a) und b) in der durch die Blockierung der nicht zu ligierenden Enden festgelegten Orientierung,
- d) Entfernen nicht verbrauchter Reaktanden sowie Enzyme,



- e) Spaltung des Ligationsproduktes aus Schritt c) mit einem *TypII*S Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, wobei die Spaltung im Oligonukleotid aus Schritt a) oder b) stattfindet,
- f) Abtrennen des so verlängerten Nukleinsäuremoleküls vom Reaktionsgemisch.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das in Schritt ab) oder bb) eingesetzte Oligonukleotid ein durch das Verfahren nach Anspruch 1 hergestelltes Nukleinsäuremolekül ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei nach Schritt ac), bc) oder c) als Schritt ac)', bc)' oder c)' eine Exonuklease- und/oder Phosphatase-Reaktion durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Reaktionsgemisch des Schrittes ac)', bc)' oder c)' nach der Reaktion entfernt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Oligonukleotid aus Schritt a), aa) oder ba) an dem Ende, welches nicht an die Matrix gekoppelt ist, einen Teil einer Erkennungssequenz für ein *TypII*S Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, und der andere Teil der Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym vom Oligonukleotid aus Schritt ab), bb) oder b) stammt.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, wobei die Modifikation ein Biotinrest, ein Digoxigeninrest, ein Fluoresceinisothiocyanatrest, eine Aminoverbindung oder ein Succinylester ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Oligonukleotid aus Schritt aa), ba) oder a) und/oder ab), bb) oder b) über einen Loop verfügt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Oligonukleotid aus Schritt aa), ba) oder a) über eine Modifikation im Loopbereich an die feste Matrix gekoppelt ist.



9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die feste Matrix ein Kügelchen (bead), vorzugsweise aus Glas oder Polystyrol, ein Objekträger, ein DNA Chip, die Vertiefung einer Mikrotiterplatte (well) oder ein Reaktionsröhrchen ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die feste Matrix einen Streptavidinrest, einen anti-Digoxigenin-Antikörper oder anti-Fluoresceinisothiocyanat-Antikörper umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Oligonukleotide aus Schritt aa), ba) oder a) und ab), bb) oder b) an ihren zu ligierenden Enden über zueinander komplementäre Einzelstrangüberhänge verfügen.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Einzelstrangüberhänge 1, 2, 3, 4 oder 5 Nukleotide lang sind.

13. Verfahren nach Anspruch 1 bis 12, wobei die verschiedenen TypIIS Restriktionsendonukleasen durch analog schneidende Ribozyme ersetzt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Oligonukleotid in Schritt ab), bb) oder b) ein PCR-Produkt, ein Plasmidvektor, eine Phagen- oder Virus-DNA, ein künstliches Chromosom oder eine weitere synthetische DNA ist.

15. Kit zur Herstellung einer Nukleinsäuresequenz nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend

- a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein TypIIS Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem Typ IIS Restriktionsenzym aus aa), ba) oder

- a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym aus Schritt aa) ba) oder a) enthält,
- c) eine feste Matrix,
- d) Reservoirs der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien.

16. Vorrichtung zur automatisierten Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch charakterisiert, dass sie

- a) eine Bibliothek von 1 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei die Oligonukleotide über eine Modifikation an einem Ende an eine feste Matrix koppelbar sind und das Oligonukleotid eine Erkennungssequenz oder einen Teil der Erkennungssequenz für ein Typ II Restriktionsenzym enthält, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet,
- b) eine weitere Bibliothek von 4 bis 1.048.576 verschiedenen Oligonukleotiden enthält, wobei jedes der Oligonukleotide eine Erkennungssequenz für ein Typ II Restriktionsenzym, welches außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, enthält, dass von dem Typ II Restriktionsenzym aus aa), ba) oder a) verschieden ist, und gegebenenfalls den anderen Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym aus Schritt aa), ba) oder a) enthält,
- c) eine feste Matrix,
- d) Reservoirs der für die Herstellung des Nukleinsäuremoleküls benötigten Enzyme und/oder anderer Reagenzien, und
- e) ein Steuerungsprogramm, das einzelne Oligonukleotide aus aa), ba) oder a) und ab), bb) oder b) identifizieren, mit der festen Matrix aus ac), bc) oder c) und den benötigten Enzymen und/oder anderen Reagenzien aus ad), bd) oder d) zusammenbringen und die Abfolge von Herstellungsschritten bestimmen und durchführen kann.

GEÄNDERTES BLATT

